

Chemische Synthese und Biosynthese von spezifisch isotopenmarkierten Carotinen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

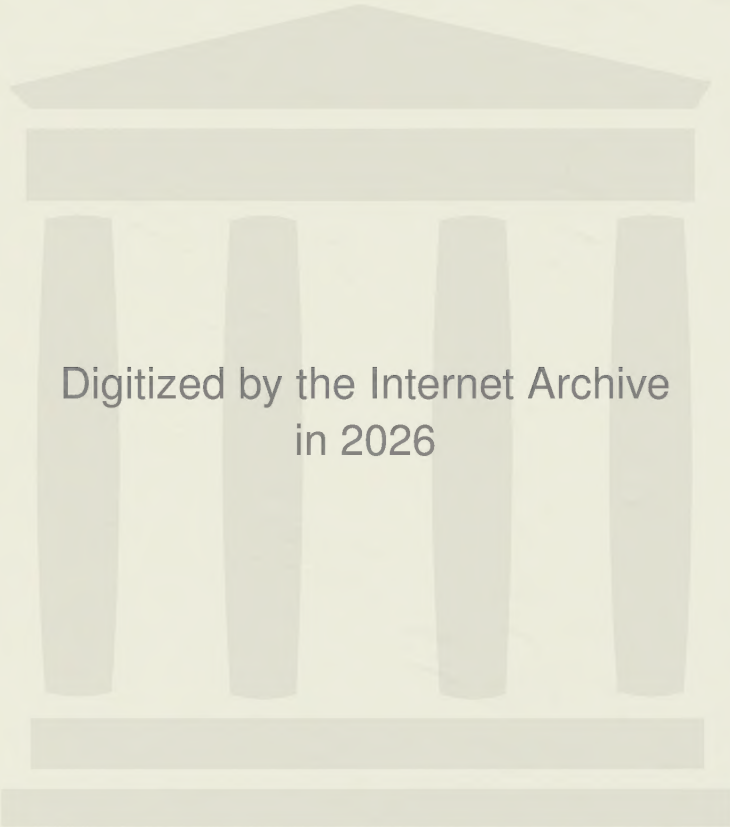
von

ARNOLD HOFER
aus Rothrist AG

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. C.H. Eugster



Juris Druck + Verlag Zürich
1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Chemische Synthese und Biosynthese von spezifisch isotopenmarkierten Carotinen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von

ARNOLD HOFER
aus Rothrist AG

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. C.H. Eugster



Juris Druck + Verlag Zürich
1981

Chemische Synthese und Biogenese von
organischen Isoprenoiden Carolinen

VERLAG VON

DE GRUYTER

BERLIN

VERLAG VON

DE GRUYTER

BERLIN



ISBN 3 260 04880 4

Meiner lieben Mutter

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. Conrad Hans Eugster

unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit entstanden ist, danke
ich herzlich für sein stetiges Interesse und seine wertvollen An-
regungen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	10
II. Bisherige Kenntnisse über die Carotin-Biogenese	11
1. Reaktionen und Stereochemie der Carotinvorläufer	11
2. Stereochemische Aspekte der Ringschlussreaktion	19
3. Widersprüche in der Stereochemie des Ringschlusses	19
4. Die 8 stereochemisch verschiedenen Faltungen	21
5. Folgerungen unter Berücksichtigung der Eliminations-Stereo- elektronik	24
6. Zusammenstellung bekannter Carotin-Endgruppen und Korre- lation mit den möglichen Faltungen	26
6.1. β -Endgruppen	26
6.2. ϵ -Endgruppen	26
6.3. γ -Endgruppen	27
7. Experimentelle Evidenzen für das Vorliegen von (5,6Z)- Doppelbindungen.	27
III. Eigene Arbeiten 1. Teil	30
1. Ziel	30
2. In vivo-Carotin-Biosynthese ab C_5 -Vorläufer	31
2.1. Synthese von $[3',3',3'-^2H_3]$ -3-Hydroxy-3-methyl- glutarsäure	31
2.1.1. Synthesepplan	31
2.1.2. Darstellung von $[2,2,2-^2H_3]$ Essigsäure- methylester	31
2.1.3. Darstellung von $[4',4',4'-^1H_3]$ resp. $[4',4',4'-^2H_3]$ 4-Hydroxy-4-methyl-1,6-heptadien	32

2.1.4. Darstellung von $[3',3',3'-^1\text{H}_3]$ resp. $[3',3',3'-^2\text{H}_3]$ 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure	32
2.2. Inkorporationsversuche mit <i>Chlorella vulgaris</i>	33
2.2.1. Versuchs-planung und -durchführung	33
2.2.2. Isolierung der Carotinoide	35
2.2.3. Ergebnisse der Radioaktivitätsmessungen	36
2.3. Inkorporationsversuche in Speisekürbis	38
2.3.1. Versuchsdurchführung	38
2.4. Folgerungen aus den Inkorporationsversuchen	38
IV. Bisherige in vitro-Cyclisierungen mit Zell-extrakten	40
V. Bisherige Synthesen deuterierter Carotinoide	41
1. Biosynthesen deuterierter Carotinoide	41
2. Chemische Synthesen deuterierter Carotinoide	42
2.1. Reduktion von Alkinen mit D_2 und Lindlar-Katalysatoren	42
2.2. Reduktion von α -Hydroxyalkinen mit LiAlH_4 oder LiAlD_4	45
2.3. Reduktion von allylständigen Ketogruppen mit $\text{LiAlD}_4/\text{AlCl}_3$	47
2.4. Reduktion von Ketogruppen mit LiAlD_4	47
2.5. Reduktion von allylischen Carbonsäuren und -estern mit LiAlD_4 ; Verwendung ^2H -markierter Wittigsalze	49
2.6. Aldolkondensationen von $[^2\text{H}_6]$ Aceton mit ungesättigten Aldehyden	52
2.7. Grignardreaktionen von Ketoverbindungen mit Deutero-vinylmagnesiumbromid	54

2.8. Deuteriumeinbau durch Austauschreaktion	55
VI. Möglichkeiten der Funktionalisierung der Methylgruppen der Isopropyliden-Endgruppe	57
1. Stereospezifische Oxidation einer der beiden geminalen Methylgruppen	57
2. Stereoselektive Wittig-Reaktion	59
3. Funktionalisierung über den Phenylsulfenylchlorid-Komplex	60
4. Biologische Funktionalisierung der Isopropyliden-Endgruppe	61
5. Andere Funktionalisierungsmöglichkeiten	61
VII. Eigene Arbeiten 2. Teil	63
Synthese von $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin	
1. Durchführung der Synthese, Uebersicht	63
2. Identifizierung der deuterierten Verbindungen	66
2.1. Gaschromatographische Trennung von $[8,8,8-^1\text{H}_3]$ und $[8,8,8-^2\text{H}_3]$ Geranylbenzyläther	66
2.2. NMR.-spektroskopische Beweise	67
2.2.1. Beweis auf der Ester-Stufe	67
2.2.2. Beweis auf der Geranylbenzyläther-Stufe	68
2.3. NMR.-Spektren von undeutertem und von $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin	70
2.4. Massenspektren von undeutertem und von $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin	74
VIII. Erwartungen, Ausblick	75
IX. Verdankungen	77

X. Experimenteller Teil	78
1. Allgemeines	78
1.1. Apparatives	78
1.2. Chromatographie	79
1.3. Schmelzpunkte	79
1.4. Reinheit der Chemikalien und Produkte	79
1.5. Abkürzungen	80
1.6. Verbrennungsanalyse deuterierter Verbindungen	80
2. Synthese von $[3',3',3'-^2\text{H}_3]$ 3-Hydroxy-3-methylglutar- säure	81
2.1. $[2,2,2-^2\text{H}_3]$ Essigsäuremethylester	81
2.2. $[4',4',4'-^2\text{H}_3]$ 4-Hydroxy-4-methyl-1,6-heptadien	81
2.3. $[3',3',3'-^2\text{H}_3]$ 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure	82
3. Inkorporationsversuche in Algen	84
3.1. Apparatives	84
3.2. Zubereiten der radioaktiven Reagenzien	84
3.3. Wachstum und Inkorporation	85
3.3.1. Algenkultur 1	85
3.3.2. Algenkultur 2	85
3.3.3. Algenkultur 3	85
3.3.4. Algenkultur 4	85
3.4. Ernte der Algen, Extraktion	90
3.5. Verseifung der Extrakte	90
3.6. Hypophasen-/Epiphasen-Trennung	90
3.7. Chromatographie der Hypophase	91

3.8. Radioaktivitätsmessungen an Extrakten und an Lutein	91
3.8.1. Algenkultur 1	91
3.8.2. Algenkultur 2	91
3.8.3. Algenkultur 3	92
3.8.4. Algenkultur 4	92
4. Inkorporationsversuche in Speisekürbis; Extraktion, Aufarbeitung	93
4.1. Chromatographie und Kristallisation	93
5. Synthese von $[17, 17, 17, 17', 17', 17' - ^2\text{H}_6]$ Lycopin	94
5.1. (2E, 6E)-1-O-Benzyl-3, 7-dimethyl-2, 6-octadien	94
5.2. (2E, 6E)-8-O-Benzyl-2, 6-dimethyl-2, 6-octadienol	94
5.3. (2E, 6E)-8-O-Benzyl-2, 6-dimethyl-2, 6-octadienal	95
5.4. Darstellung des zur Allyloxydation verwendeten MnO_2	96
5.5. (2E, 6E)-8-O-Benzyl-2, 6-dimethyl-2, 6-octadien-1-carbonsäure und -methylester	96
5.6. $[1, 1 - ^2\text{H}_2]$ (2E, 6E)-8-O-Benzyl-2, 6-dimethyl-2, 6-octadienol	97
5.7. $[1, 1 - ^2\text{H}_2]$ (2E, 6E)-8-O-Benzyl-2, 6-dimethyl-2, 6-octadienylbromid	98
5.8. $[8, 8, 8 - ^2\text{H}_3]$ (2E, 6E)-1-O-Benzyl-3, 7-dimethyl-2, 6-octadien	99
5.9. $[8, 8, 8 - ^2\text{H}_3]$ (2E, 6E)-3, 7-dimethyl-2, 6-octadienol	100
5.10. $[8, 8, 8 - ^2\text{H}_3]$ (2E, 6E)-1-Bromo-3, 7-dimethyl-2, 6-octadien	101
5.11. $[8, 8, 8 - ^2\text{H}_3]$ (2E, 6E)-3, 7-Dimethyl-2, 6-octadienyl-1-triphenylphosphoniumbromid	101
5.12. $[17, 17, 17, 17', 17', 17' - ^2\text{H}_6]$ Lycopin	101
XI. Literaturverzeichnis	103
Lebenslauf	113

I. Einleitung

Carotine und Carotinoide¹⁾ sind in der belebten Natur weit verbreitet. Man findet sie sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich. Die Anzahl der strukturell aufgeklärten Carotinoide wurde 1976 mit 400 angegeben [1]; laufend werden solche mit neuen Strukturen entdeckt. Von besonderem Interesse werden in Zukunft vor allem sehr polare Carotinoide sein, welche ihrer Eigenschaften wegen noch nicht erforscht sind, und viel Arbeit wird auch für die Ermittlung der absoluten Konfiguration von Carotinoiden bekannter oder noch unbekannter Konstitution nötig sein. Relativ wenig ist über die Funktion der Carotinoide in der Natur bekannt [2]. Ausser zum Zwecke der Farbgebung dienen sie als Filter für sichtbares Licht und sind in noch ungeklärter Weise an der Fotosynthese beteiligt [2]. Einige wenige besitzen Vitamin-A-Aktivität [3]. Auch nicht vollständig geklärt ist die Biogenese der Carotinoide; vor allem stereochemische Probleme sind noch zu lösen.

Ein spezielles, noch ungelöstes Problem ist die Stereochemie der Ringschlussreaktion der offenkettigen zu den ringgeschlossenen Carotinoiden. Durch gezielten Einbau von Isotopenmarkierung in Carotinoide soll die vorliegende Arbeit ein Beitrag zur Abklärung dieser Ringschlussreaktion sein.

1) Der Ausdruck "Carotinoide" gilt heute allgemein sowohl als Sammelbegriff für Derivate von Carotinen und für Carotine (= reine Kohlenwasserstoffe) als auch nur für die erstgenannten allein.

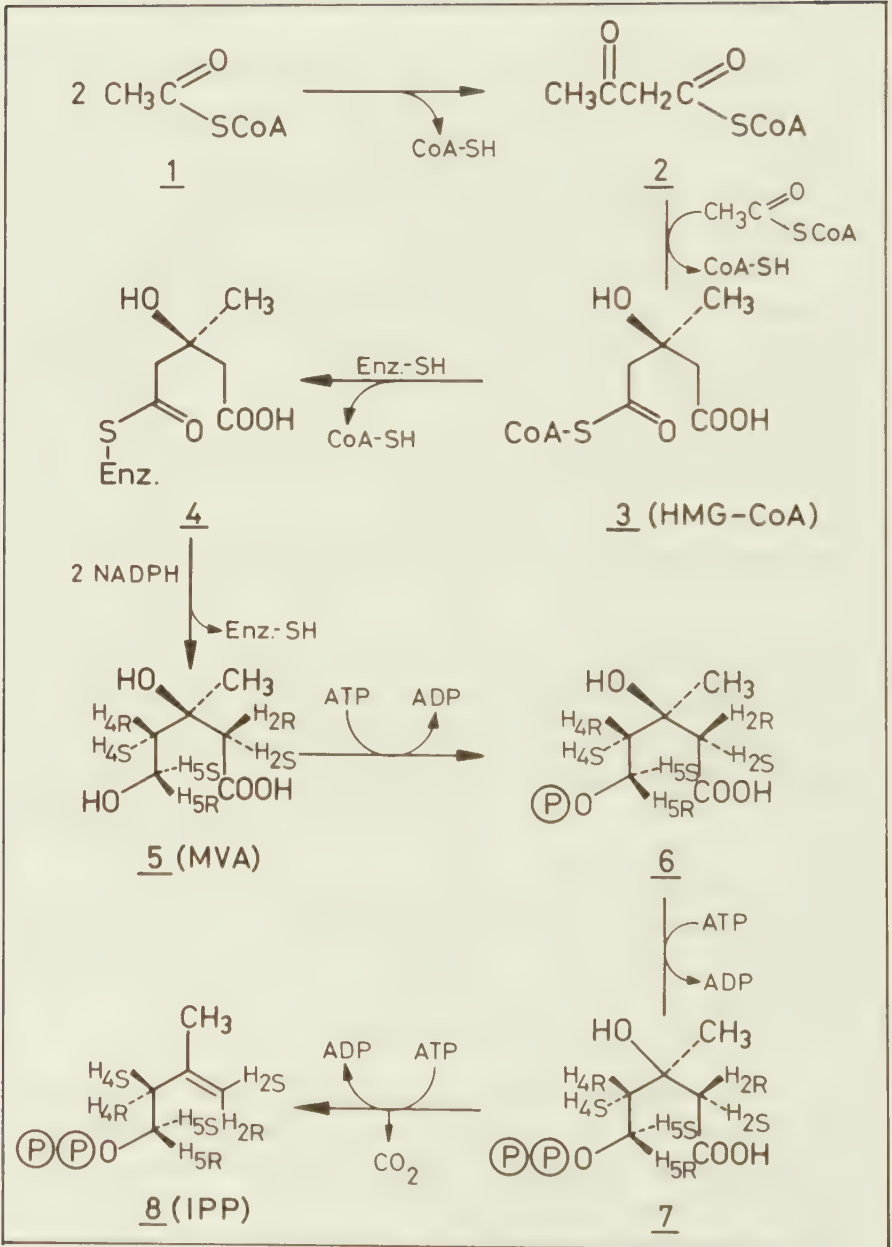
II. Bisherige Kenntnisse über die Carotin-Biogenese

1. Reaktionen und Stereochemie der Carotinvorläufer (nach [4])

Carotinoide sind Tetraterpene und als solche aus 8 Isopreneinheiten aufgebaut. Als biologischer Isoprenvorläufer wird Isopentenylpyrophosphat (8) (IPP) angesehen, welches gemäss Schema 1 aus Acetyl-CoA (1) über Hydroxymethylglutarsäure (3, HMG) und Mevalonsäure (5, MVA) entsteht [4]. HMG-CoA kann alternativ auch aus den Aminosäuren Leucin und Valin entstehen [5]. Zu beachten ist insbesondere, dass bei der Bildung von IPP aus MVA das C-Atom 1 der MVA als CO₂ abgespalten wird und für Isotopenmarkierung ungeeignet ist.

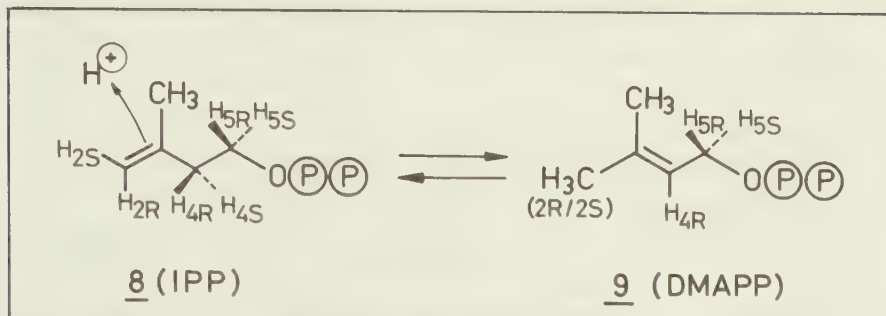
Die Stereochemie der Eliminierung der Carbonyl- und der Hydroxylgruppe an C(3) aus MVA-Pyrophosphat (7) entspricht einer trans-Fragmentierung, wie durch Markierungsexperimente mit (2R)-[2-²H] MVA gezeigt werden konnte [6], wobei [4-(Z)-²H] IPP gebildet wurde. Weiter ist bekannt, dass nur das natürlich vorkommende (3R)-konfigurierte Enantiomere der MVA konvertiert wird, wie dies bei Inkorporationsversuchen in Steroide gezeigt worden ist [7]. Die ersten Inkorporationsversuche von [2-¹⁴C] MVA in Carotine wurden an Phycomyces blakesleeanus [8-11], Mucor hiemalis [12], Blakeslea trispora [13], Neurospora crassa [14], Carottenscheiben [8, 15], Tomaten [8, 16-18], usw. durchgeführt. Schwierigkeiten mit MVA wegen zu kleiner Zellmembranpermeabilität traten bei Euglena gracilis v. bacillaris [8], E. gracilis strain Z [19], Chlorella pyrenoidosa [13] und verschiedenen keimenden Sämlingen auf [20-22]. HMG wurde inkorporiert in Carotinoide von Phycomyces blakesleeanus [9, 23]. In E. gracilis wurde [¹⁴C] HMG zwar aufgenommen, aber nicht inkorporiert [24].

Der nächste Schritt zur Bildung der Terpene ist die Isomerisierung eines Moleküls IPP (8) zu Dimethylallylpyrophosphat (9) (DMAPP) (Schema 2) [25, 26]. Es wurde gezeigt, dass bei Experimenten mit (4R)-[4-³H] resp. (4S)-[4-³H] MVA bei dieser Isomerisierung das pro(R)-Wasserstoffatom an C(2) von IPP eliminiert wird, welches dem pro(S)-Wasserstoffatom an C(4) von MVA entspricht [27]. Demzufolge wurde ein Zwischenstufenmechanismus postuliert (Schema 2).



Schema 1 Bildung von IPP aus Acetyl-CoA

H_{2R} , H_{2S} etc. bedeuten pro(R)-H-C(2), pro(S)-H-C(2) etc. und beziehen sich durchwegs auf die Mevalonsäure.



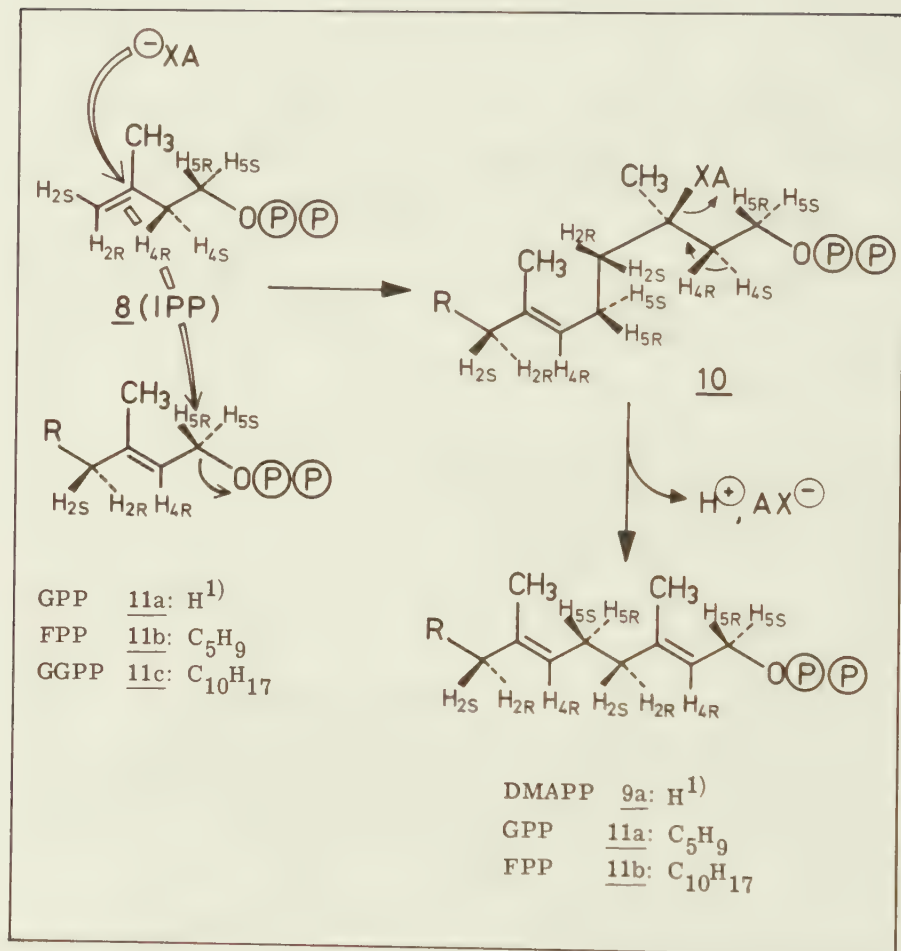
Schema 2

Bildung von DMAPP aus IPP

Enzymatisch mit Hilfe von Prenyl-Transferase wird nun gemäss Schema 3 1 Molekül IPP und 1 Molekül DMAPP zu Geranylpyrophosphat (11a, GPP, C_{10}) verknüpft [25, 28-30]; eine zweite Anlagerung von IPP an GPP führt zu Farnesylpyrophosphat (11b, C_{15}) [31-34], eine dritte an FPP zu Geranylgeranylpyrophosphat (11c, GGPP, C_{20}) [31, 35-37].

Erst in neuester Zeit [38] wurde auf der Stufe von Geraniol der Beweis erbracht, dass von den beiden geminalen Methylgruppen die (E)-ständige aus dem C-Atom C(2) von $[2-^{14}C]$ MVA stammt. Vorher war dies jeweils stillschweigend angenommen worden. Zur Beweisführung liessen Akhila und Banthorpe [38] $[2-^{14}C]$ MVA in Blütenblätter von Rosa dilecta inkorporieren und fanden im daraus isolierten Geraniol die Markierung ausschliesslich in C(4) und in der (E)-ständigen Methylgruppe, je zu gleichen Anteilen. Die Inkorporationsrate betrug bis zu 22% des (R)-Isomeren der MVA.

Experimente mit (4R)- resp. (4S)- $[2-^{14}C-4-^3H]$ MVA zeigten, dass sowohl bei der Phytoen-biosynthese in Pflanzen und Mikroorganismen als auch bei der Squalenbiosynthese in Tieren jeweils immer das pro(S)-H-Atom von C(4) der MVA eliminiert wird [39] (siehe Schema 2 und 3) und dass alle allylischen Doppelbindungen (E)-konfiguriert sind, im Gegensatz zu Kautschuck, bei welchem pro(R)-H-C(4) eliminiert wird [40].



Schema 3

Kettenverlängerung bei der Terpenbiogenese

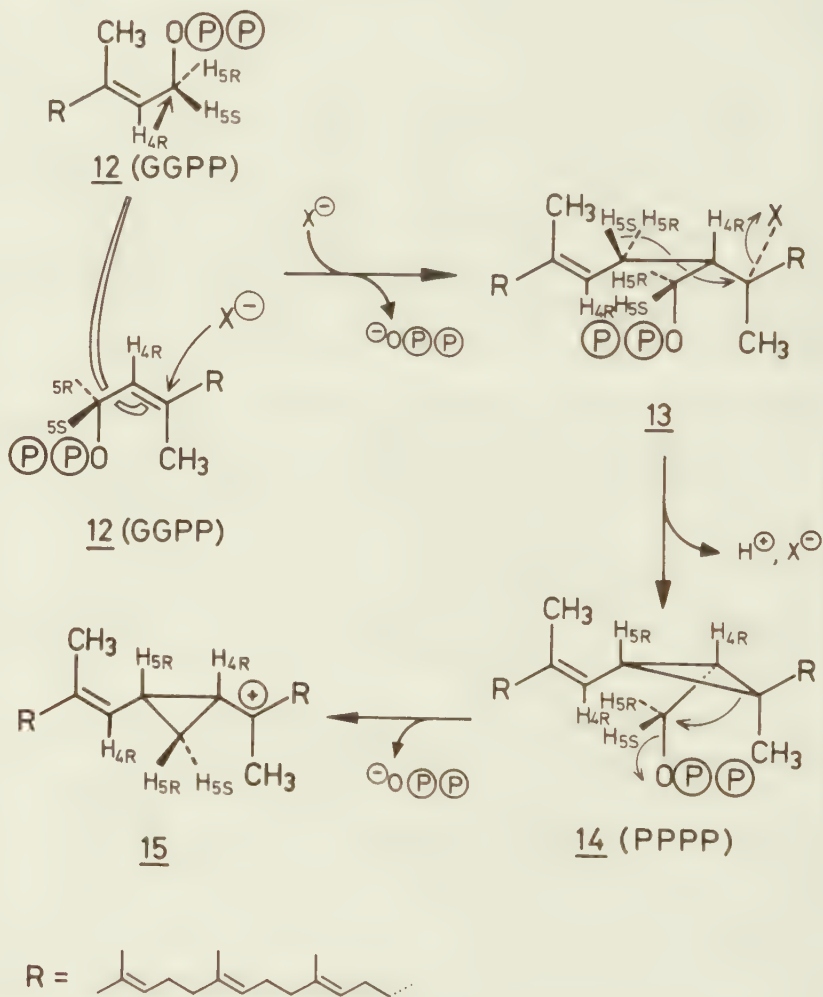
- 1) Für $R = H$ ist die Zuordnung H_{2R} und H_{2S} an der endständigen (E)-Methylgruppe nicht bestimmt (siehe Schema 2).

Durch eine C-C-Schwanz-Verknüpfung wird nun, formell unter Abspaltung zweier H-Atome je von C(1) von GGPP Phytoen als C₄₀-Gerüst erhalten. Für die Stereochemie relevant ist die Tatsache, dass z. B. in Tomatenscheiben oder isolierten Chloroplasten die zwei pro(S)-H-Atome eliminiert werden, was zu einer zentralen (Z)-konfigurierten Doppelbindung in Phytoen höherer Pflanzen führt [41, 42]. Elimination eines pro(S)- und eines pro(R)-H-Atoms führt zu einer (E)-konfigurierten Doppelbindung. (15E)-Phytoen wurde gefunden in Flavobacterium dehydrogenans [43], Mucor hiemalis [44], R. rubrum und Rhodospseudonomas sphaeroides [45]. Im Gegensatz zur Bildung von Squalen wird zur Bildung von Phytoen kein NADPH gebraucht.

Zur Erklärung dieser stereochemischen Gegebenheiten wurden verschiedene Mechanismen formuliert. Williams et al. [4, 46] postulierten einen Mechanismus, bei welchem die beiden Geranylgeranyl-Hälften über ein Sulfoniumylid verknüpft werden, dessen Thioäthergruppierung möglicherweise aus einem Methionin-Rest des Enzyms Phytoen-synthetase stammt. Durch trans-Elimination eines Protons und des CH₃-S-Enzym-Rests wird - je nach Konfiguration - (E)- oder (Z)-Phytoen erhalten (siehe auch die Zusammenfassung in [47]).

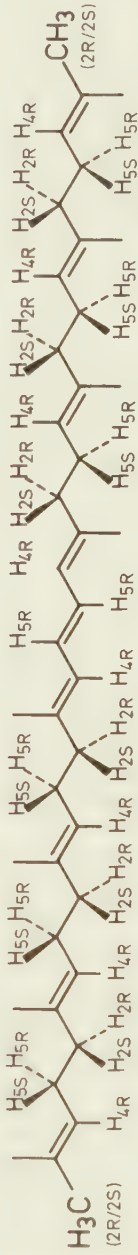
In neueren Arbeiten ([48, 49, 50], siehe auch [47, 51]) wurde gezeigt, dass sowohl für die Biosynthese von Squalen als auch von Phytoen ein analoger Mechanismus über Präsqalen resp. Präphytoen und ein Cyclopropylcarbinylkation anzunehmen ist (Schema 4). Dieses Kation 15 kann auf drei verschiedene Arten stabilisiert werden: Aufnahme eines Hydridions von NADPH führt zu Lycopersen (16), Elimination von H_S⁺ zu (all E)-Phytoen und Elimination von H_R⁺ zu (15Z)-Phytoen (18) (Schema 5). Damit ist auch gezeigt, dass die Biosynthese von Phytoen nicht zwingend über Lycopersen verlaufen muss. Letzteres kann nebenbei entstehen durch Einwirkung eines nichtspezifischen Squalen-Synthetase-Systems und NADPH.

Sukzessive werden nun, von der zentralen Doppelbindung ausgehend, durch Dehydrierung Doppelbindungen eingeführt [4]. Alle Zwischenstufen wurden isoliert. Die Ringschlussreaktion zu den ε, β- oder

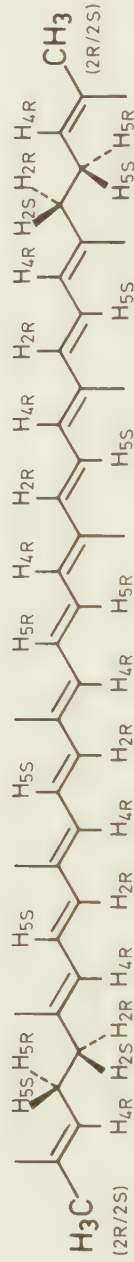


Schema 4

Bildung von Präsqualenpyrophosphat und des Cyclopropylcarbinylkations aus 2 Molekülen GGPP.



19



20

Schema 6

Stellung der prochiralen H-Atome der Mevalonsäure in Phytoen 19 und Lycopin 20

γ -Carotinendgruppen kann von Lycopin oder von Neurosporin ausgehen.

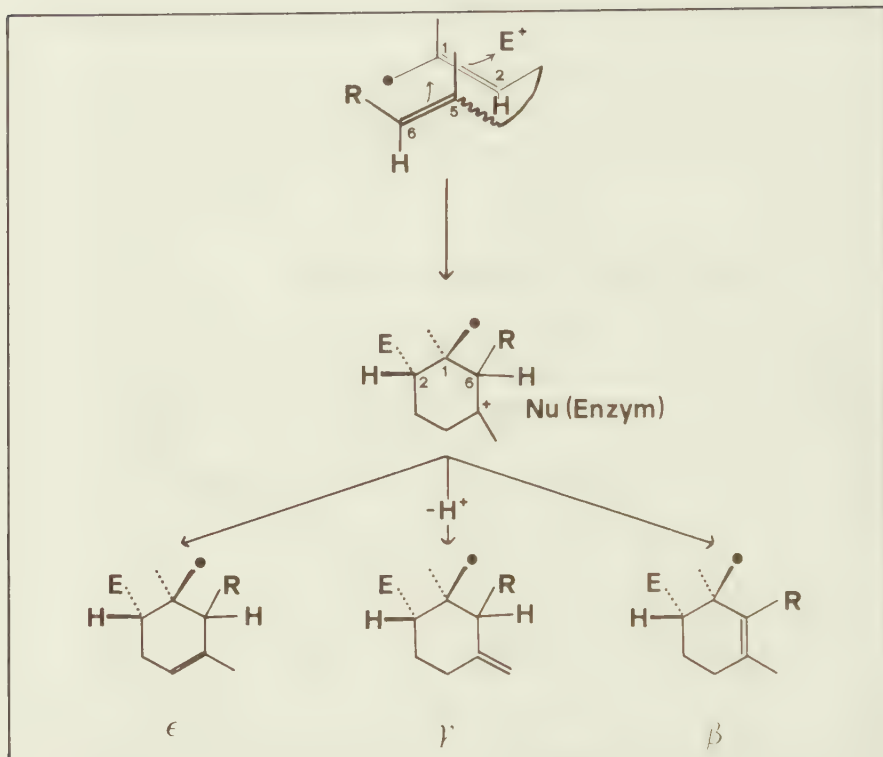
Zusammenfassend sei an den Strukturformeln von Phytoen (19) und Lycopin (20) im Detail erläutert, welche prochiralen H-Atome der MVA an welcher Stelle in den beiden Carotinen wiedergefunden werden (Schema 6).

2. Stereochemische Aspekte der Ringschlussreaktion

Gemäss dem allgemeinen Cyclisationsschema (Schema 7) [4] wird die Ringschlussreaktion eingeleitet durch den elektrophilen Angriff eines Elektrophils E^+ auf die 1,2-Doppelbindung des offenkettigen Vorläufers. Konzertierte dazu wird durch Öffnen der 5,6-Doppelbindung die Bindung 6,1 gebildet. Das entstehende Carbeniumion an C(5) stabilisiert sich durch Elimination eines Protons entweder von C(4), C(6) oder C(18), wobei je nachdem ein ϵ -, β - oder γ -Ring entsteht. Die konzertierte Reaktion bedingt, dass das Elektrophil E und die neu gebildete Bindung durch antiperiplanare Anordnung nach dem Ringschluss trans zueinander stehen, wie dies auch experimentell bei der Biosynthese von Zeaxanthin (22) durch *Flavobacterium* mit ^{13}C -markierter MVA und Ausführen des Ringschlusses nach Umklimatisieren der Bakterien in D_2O gefunden wurde [52].

3. Widersprüche in der Stereochemie des Ringschlusses

Im erwähnten Biosyntheseexperiment von Goodwin und Britton [52] mit Bakterien wurde die ^{13}C -Markierung in den beiden pro(S)-Methylgruppen an C(1) und C(1') des β -Rings und, wie erwartet, trans zum ^2H -Isotop an C(2) gefunden. Dieses Experiment steht aber stereochemisch im Widerspruch zu einem Experiment von Bu'Lock [53, 54], welcher bereits 1970 gezeigt hatte, dass in β, β -Carotin (21), welches durch *Blakesleea trispora* biosynthetisiert worden war, die Markierung in der pro(R)-Methylgruppe vorhanden war und aus der ehemals (E)-ständigen Methylgruppe des offenkettigen Vorläufers (aus C(2) der MVA) gebildet wurde. In c.p. 450 (23) [55], welches an



Schema 7

Allgemeines Cyclisationsschema

C(2) isoprenyliert ist, wurde an C(2) (S)-Chiralität gefunden, was ebenfalls im Widerspruch zur Stellung des 2H -Isotops im Experiment von Goodwin und Britton [52] steht. Man setzt dabei voraus, dass der Ringschluss durch den Angriff eines Dimethylallylkations als Elektrophil wie im Falle des H^+ resp. D^+ eingeleitet wird.

Da in den obengenannten Experimenten einerseits mit Bakterien, andererseits mit Pilzen gearbeitet wurde, ist nicht zwingend eine Übereinstimmung zu erwarten. Es scheint aber, dass es in der Natur in verschiedenen Organismen verschiedene Faltungsmechanismen gibt. Für die Stereochemie der Cyclisierung ist mit einiger

Wahrscheinlichkeit auch die Konfiguration der 5,6-Doppelbindung verantwortlich [56], welche bisher immer stillschweigend als (E)-konfiguriert vorausgesetzt wurde.

4. Die 8 stereochemisch verschiedenen Faltungen (nach [56])

Gemäss dem allgemeinen Cyclisationsschema (Schema 7) ergeben sich unter den Voraussetzungen,

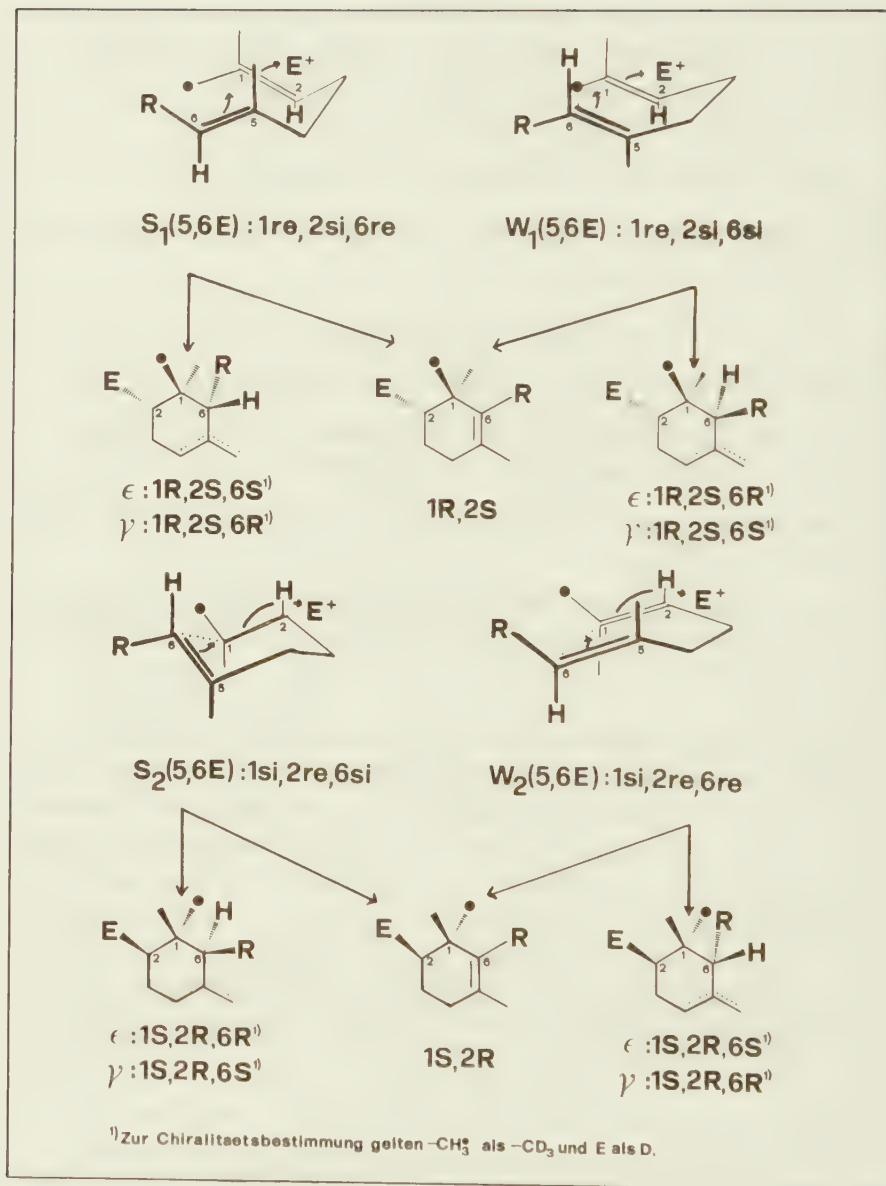
- dass ein konzertierter Mechanismus vorliegt,
- dass sowohl Sessel- als auch Wannenfaltung möglich ist,
- dass die Konfiguration der 5,6-Doppelbindung durch die Prochiralität der Doppelbindungsebene eine entscheidende Rolle spielt,
- dass die geminalen Methylgruppen während des Ringschlusses ihre Identität bewahren,
- dass als Elektrophil E^+ mit den gleichen stereochemischen Konsequenzen sowohl H^+ als auch ein positiv geladener Isoprenrest dienen kann,

theoretisch 8 stereochemisch verschiedene Faltungen. Diese gliedern sich in je 4 für eine (E)-konfigurierte 5,6-Doppelbindung (Schema 8) und je 4 für eine (Z)-konfigurierte 5,6-Doppelbindung (Schema 9). Diese je 4 Faltungen gliedern sich weiter auf in je 2 Sessel und 2 Wannen, welche ihrerseits in je 2 enantiomeren Formen zu betrachten sind.

Die Isotopenmarkierung im offenkettigen Vorläufer wurde für die Herleitung der Faltungen in der (E)-ständigen Methylgruppe an C(1) resp. C(1') angenommen.

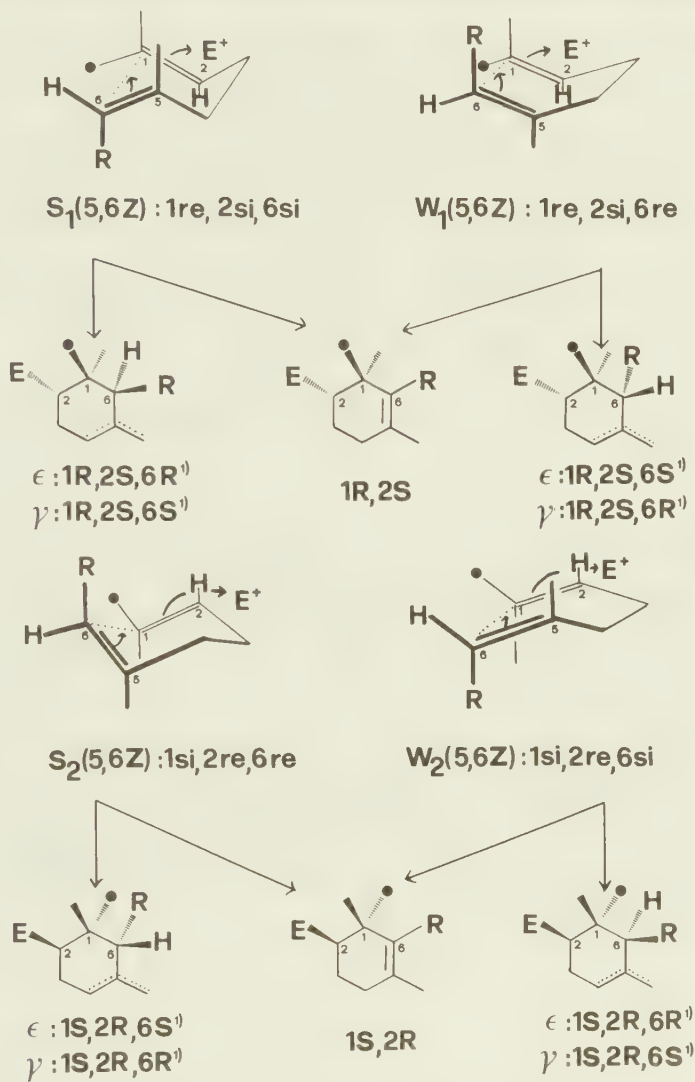
Bezogen auf die Chiralitäten an den Zentren 1, 2 und 6 der geschlossenen Ringe lassen sich zusammenfassend folgende Regeln aufstellen:

- Elektrophil E und CD_3 -markierte Methylgruppen an C(1) stehen in



Schema 8

Faltungen mit (5,6 E)-Doppelbindung im Vorläufer



¹⁾Zur Chiralitätsbestimmung gelten $-\text{CH}_3^a$ als $-\text{CD}_3$ und E als D.

Schema 9

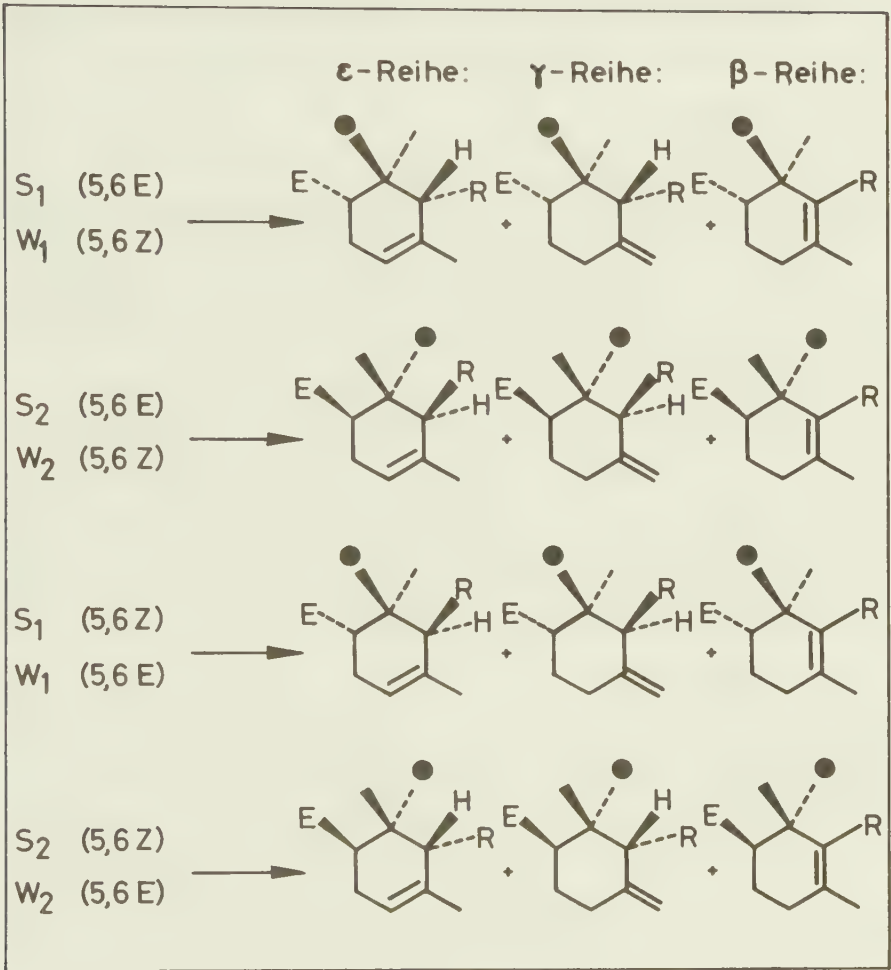
Faltungen mit (5,6 Z)-Doppelbindungen im Vorläufer

jedem Fall trans zueinander.

- Enantiomere Sessel- oder Wannenfaltung ändert die Chiralität an allen drei Zentren, d. h. sie liefern enantiomere Endgruppen.
- Umkehr der Konfiguration der 5,6-Doppelbindung bei sonst gleichem Sessel oder gleicher Wanne ergibt Epimere an C(6) für den ϵ - und den γ -Ring.
- Umkehr der Konfiguration der 5,6-Doppelbindung und Wechsel von Sessel zu (nicht enantiomerer) Wanne führt zu identischen Ringen (gleiche Chiralität an allen drei Zentren), siehe Schema 10.

5. Folgerungen unter Berücksichtigung der Eliminations-Stereo-elektronik

Unter der Annahme, dass durch die Fixierung am Enzym für die Protonenelimination dieselbe Konformation wie für die Faltung und den Ringschluss vorliegt und dass bevorzugt eine anti-Elimination erfolgt, wären die Faltungen über S_1 (5,6 E), S_2 (5,6 E), W_1 (5,6 E) und W_2 (5,6 E) zum β -Ring bevorzugt. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass die Konfiguration der 5,6-Doppelbindung produktbestimmend wirkt, indem (E)-Konfiguration u. a. zu einem β -Ring, (Z)-Konfiguration bevorzugt nur zu einem ϵ - oder γ -Ring führen dürfte [56], d. h. ein ϵ - oder γ -Ring könnte sowohl aus einer (5,6 E)- als auch einer (5,6 Z)-Doppelbindung entstehen, ein β -Ring dagegen nur aus einer (5,6 E)-Doppelbindung. Zu definitiven Aussagen fehlen zurzeit aber experimentelle Beweise.



Schema 10

Zusammenfassung der Produkte aus den verschiedenen Faltungen

6. Zusammenstellung bekannter Carotin-Endgruppen und Korrelation mit den möglichen Faltungen [56], siehe Schema 11

6.1. β -Endgruppen

Es sei nochmals auf die Experimente von Bu'Lock [53, 54] und von Goodwin [52] hingewiesen. In β, β -Carotin (21) aus Blakeslea trispora [53, 54] stammt die pro(R)-Methylgruppe aus der ehemals (E)-ständigen Methylgruppe des offenkettigen Vorläufers. Dies entspricht einer S_1 - oder W_1 -Faltung, wobei keine direkte Aussage über die 5,6-Doppelbindung des Vorläufers möglich ist. Dasselbe gilt auch für Zeaxanthin (22) aus Flavobacterium [52]; der Ringschluss muss aber enantiomer über S_2 oder W_2 erfolgt sein, da das Elektrophil $^2H^+$ die 1,2-Doppelbindung von der (1si,2re)-Seite angegriffen hat (siehe Schema 11). In c. p. 450 (23) [55] wurde die 1,2-Doppelbindung vom Dimethylallylkation hingegen von der (1re,2si)-Seite angegriffen, was auf eine zum β, β -Carotin aus Blakeslea trispora analoge Faltung über S_1 oder W_1 schliessen lässt.

6.2. ϵ -Endgruppen

ϵ -Endgruppen aus höheren Pflanzen weisen durchwegs an C(6) (R)-Konfiguration auf, sofern sie an C(2) nicht isoprenyliert sind, also z. B. β, ϵ -Carotin (24) [57] oder Lutein (25) [58]. ϵ, ϵ -Carotin (26) aus Truthahnembryonen weist allerdings an beiden ϵ -Endgruppen (S)-Chiralität auf [59], während ϵ, ϵ -Carotin aus der Tomatenmutante Del/Del 65-3-54-5 die erwartete (R)-Chiralität zeigt [60]. Da im Eigelb des Embryos kein ϵ, ϵ -Carotin gefunden wurde, fand der Ringschluss entweder im tierischen Organismus statt oder β, β -Carotin wurde stereoselektiv zu (6S,6'S)- ϵ, ϵ -Carotin isomerisiert. Solche Isomerisierungen gelten allerdings wenigstens für Pflanzen als ausgeschlossen [4, 61]. In Meeresfischen wurde (6S)-konfiguriertes Tunaxanthin (27) gefunden [62]; eine Racemisierung über die Enolform der entsprechenden Ketoverbindung und stereoselektive Reduktion wäre in diesem Fall an sich vorstellbar.

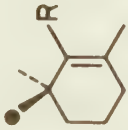
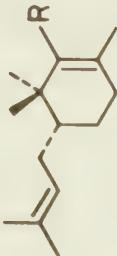
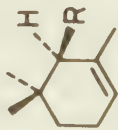
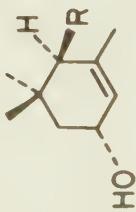
Decaprenoxanthin (28) ist (2R,6S)-konfiguriert [63] und kann über S_1 (5,6 E) oder W_1 (5,6 Z) entstanden sein (siehe dazu die Einschränkung in Kap. II. 7.).

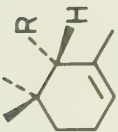
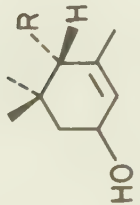
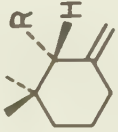
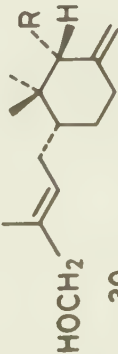
6.3. γ -Endgruppen

Alle bisher in der Natur gefundenen Carotine mit γ -Endgruppen sind (6R)-konfiguriert. Da für Sarcinaxanthin (30) sowohl die Chiralität an C(2) als auch an C(6) bekannt ist [64], bleiben nur die beiden Faltungen über S_1 (5,6 E) oder W_1 (5,6 Z) offen.

7. Experimentelle Evidenzen für das Vorliegen von (5,6 Z)-Doppelbindungen

Beim Einbau von (2R)- und (2S)-[2- ^{14}C , 2- ^3H] MVA in Tomaten der Mutante "Del" isolierten Vose et al. [65] (6R)- ϵ,ψ -Carotin und stellten aufgrund der Isotopenverhältnisse $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ fest, dass bei der Bildung des ϵ -Rings das pro(S)-H-C(2) der MVA von C(4) des Carotins eliminiert wurde. Für (2R,2'R,6R,6'R)-Decaprenoxanthin aus *Flavobacterium dehydrogenans* beobachteten Fahey und Milborrow [68] in einem ähnlichen Experiment den Verlust des pro(R)-H-C(2). Falls die in Kap. II. 5. gemachte Annahme bezüglich bevorzugter anti-Elimination richtig ist, dürfte unter Anwendung derselben für die (6R)-Konfiguration von ϵ,ψ -Carotin nur noch der Sessel S_1 (5,6 Z) und für Decaprenoxanthin die Wanne W_1 (5,6 Z) in Frage kommen, d.h. für den offenkettigen Vorläufer müsste in beiden Fällen eine (5,6 Z)-Doppelbindung gefordert werden.

<u>21</u>		β, β -Carotin [53, 54] aus <i>Blakeslea Trispora</i>	S_1	W_1
<u>22</u>		2 β -[2- 2 H] Zeaxanthin [52] aus <i>Flavobacterium</i>	S_2	W_2
<u>23</u>		c.p. 450 [55]	S_1	W_1
<u>24</u>		β, ϵ -Carotin u.a. [57]	S_2 (5,6E) S_1 (5,6Z)	W_1 (5,6E) W_2 (5,6Z)
<u>25</u>		Lutein u.a. [58]	S_2 (5,6E) S_1 (5,6Z)	W_1 (5,6E) W_2 (5,6Z)

	(6S)- ϵ,ϵ -Carotin [51] aus Truthahn-Embryos	S_1 (5,6E) S_2 (5,6Z)	W_2 (5,6E) W_1 (5,6Z)
<u>26</u>			
	(6S)-Tunaxanthin [62] aus Meerestischen	S_1 (5,6E) S_2 (5,6Z)	W_2 (5,6E) W_1 (5,6Z)
<u>27</u>			
	Decaprenoxanthin [63]	S_1 (5,6E)	W_1 (5,6Z)
<u>28</u>			
	β,γ -Carotin [67]	S_1 (5,6E) S_2 (5,6Z)	W_2 (5,6E) W_1 (5,6Z)
<u>29</u>			
	Sarcinaxanthin [64]	S_1 (5,6E)	W_1 (5,6Z)
<u>30</u>			

Schema 11

Beispiele von Carotinoiden, welche Rückschlüsse auf die Faltung zulassen.

III. Eigene Arbeiten 1. Teil

1. Ziel

Zur Abklärung der Stereochemie der Zentren C(1) und C(2) liegen bisher nur Markierungsexperimente für den β -Ring vor. Wegen Verwendung von verschiedenen Organismen wurden verschieden zu deutende Resultate erhalten. Aus C(2)-isoprenylierten C_{50} -Carotinen konnte die Stereochemie an C(2) abgeleitet werden. Ueber die Identität der geminalen Methylgruppen im C(2)-unsubstituierten ϵ -Ring ist nichts bekannt.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, durch gezielten Einbau von Isotopen in eine der geminalen Methylgruppen deren Identität während der Cyclisation verfolgen zu können.

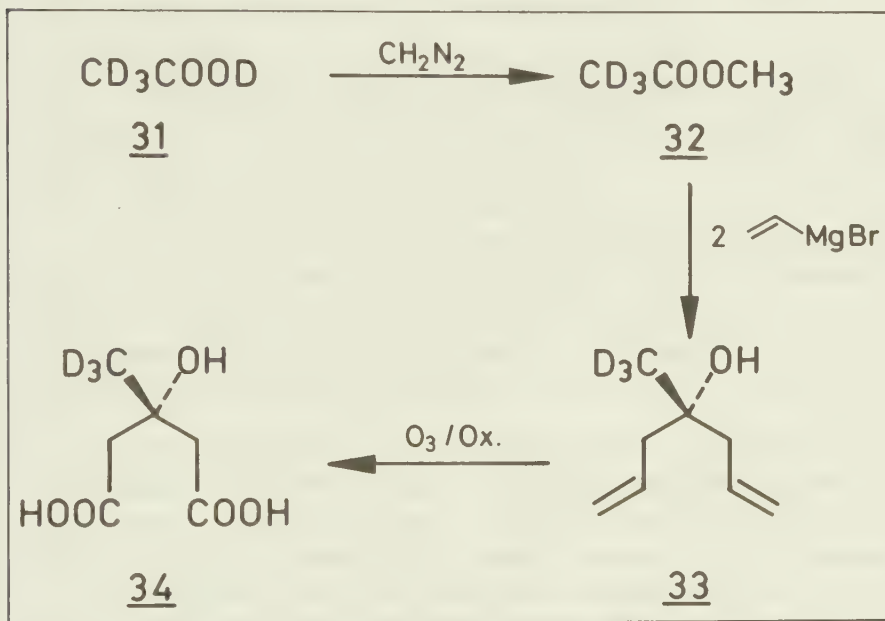
Im ersten Teil der experimentellen Arbeiten wurde versucht, die Isotopenmarkierung durch in vivo-Inkorporation eines markierten C_5 -Vorläufers in einem geeigneten Organismus an die richtige(n) Stelle(n) des Carotingerüsts zu bringen. Als C_5 -Vorläufer wurde $[3',3',3'-^2H_3]$ HMG gewählt. Die Markierung hätte - gemäss der Herleitung in Kap. II.1. - im (nicht isolierten) offenkettigen Vorläufer je in der (Z)-ständigen C(1)- CH_3 -Gruppe sowie in den Methylgruppen $CH_3(18)$, $CH_3(18')$, $CH_3(19)$, $CH_3(19')$, $CH_3(20)$, $CH_3(20')$ angenommen werden müssen. Als Organismus wurde Chlorella vulgaris und Kürbisse gewählt.

Als diese Inkorporationsversuche nicht die gewünschte Einbaurate zeigten, wurde in einem zweiten Teil der Arbeit ein stereospezifisch markierter offenkettiger C_{40} -Vorläufer in vitro synthetisch hergestellt (siehe Kap. IV).

2. In vivo-Carotin-Biosynthese ab C_5 -Vorläufer

2.1. Synthese von $[3',3',3'-^2H_3]$ 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure

2.1.1. Syntheseplan



Zur Darstellung von $[3',3',3'-^2H_3]$ HMG (34), welche vorerst undeutert hergestellt wurde, bot sich die Synthese nach [68] an. Schlüsselreaktion war eine Grignard-Reaktion von Allylmagnesiumbromid mit $[2,2,2-^2H_3]$ Essigsäuremethylester (32) zu $[4',4',4'-^2H_3]$ 4-Methyl-1,6-heptadien-4-ol (d_3 -Diallylmethylcarbinol) (33) und anschliessender Ozonolyse der beiden Doppelbindungen unter oxidativer Aufarbeitung zur $[3',3',3'-^2H_3]$ 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure (34).

2.1.2. Darstellung von $[2,2,2-^2H_3]$ Essigsäuremethylester (32)

Für die Synthese des undeuterten Endproduktes wurde von handelsüblichem Essigsäureäthylester ausgegangen; zur Synthese des

deutერიerten Produktes, ausgehend von Tetradeuteroessigsäure, musste erst der Ester dargestellt werden. Dazu eignete sich Diazomethan vorzüglich. Allerdings musste darauf geachtet werden, dass eine relativ konzentrierte, alkoholfreie und sehr trockene Diazomethanlösung in Aether verwendet wurde. Es hatte sich nämlich herausgestellt, dass es unmöglich war, den Aether ohne Verlust an $[2,2,2\text{-}^2\text{H}_3]$ Essigsäuremethylester abzudestillieren, selbst nicht über eine Kolonne von 1 m Länge mit evakuierter Doppelwandung und einer Füllung von feinporigen Drahtnetzchen (Raschig-Kolonne)¹⁾. Es wurde deshalb die Totalmenge der getrockneten Aether/Esterlösung ohne vorheriges Einengen in die Grignardreaktion eingesetzt. Dies dürfte auch der Grund sein, dass die Ausbeute der Reaktion zum deutერიerten Produkt geringer war als zum undeutერიerten.

2.1.3. Darstellung von $[4',4',4'\text{-}^1\text{H}_3]$ resp. $[4',4',4'\text{-}^2\text{H}_3]$ 4-Methyl-4-hydroxy-1,6-heptadien (Diallylmethylcarbinol, 33)

Die Grignardreaktion zum 3'-d₀- resp. 3'-d₃-Diallylmethylcarbinol verlief ohne Schwierigkeiten. Im Unterschied zu [68] wurde jedoch nicht mit H₂SO₄, sondern nach [69] mit gesättigter NH₄Cl-Lösung aufgearbeitet. Die Alternativmethoden mit Allylchlorid nach [70] anstelle von Allylbromid wurden nicht versucht, ebenfalls nicht die Verwendung von ZnCl₂, Allyljodid und Essigsäureester nach [71] resp. -anhydrid nach [72], da die entsprechenden Literaturausbeuten zu gering waren.

2.1.4. Darstellung von $[3',3',3'\text{-}^1\text{H}_3]$ resp. $[3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure (34)

$[4',4',4'\text{-}^2\text{H}_3]$ 4-Hydroxy-4-methyl-1,6-heptadien (33) wurde in einem Gemisch von Essigsäureäthylester und Eisessig (5:1) ozonisiert und das Ozonid oxidativ mit H₂O₂ unter Zusatz von etwas Schwefelsäure aufgearbeitet. Besondere Beachtung galt der Entfernung der Schwefelsäure neben der entstandenen Dicarbonsäure sowie der Zerstörung von

1) Der Nachweis des Esters im Aether erfolgte durch Beobachtung der Bande im IR. bei ca. 5,8 μ gegen Aether als Referenz.

H₂O₂ vor Kontakt des Produktes mit Aether. Auch die Handhabung des Ozonids scheint nicht frei von Gefahren zu sein, siehe dazu [73].

2.2. Inkorporationsversuche in Chlorella vulgaris

2.2.1. Versuchsplanung und -Durchführung

Die Inkorporationsversuche mit der synthetisierten [3',3',3'-²H₃] 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure (3'-d₃-HMG) wurden an einzelligen Algen Chlorella vulgaris (ETH-Stamm 211, 11/h von Göttingen) durchgeführt, deren Hauptcarotin das Lutein ist.

Das Ziel der Inkorporationsversuche war es, den Algen während ihres Wachstums den markierten Terpenvorläufer ins Nährmedium zu geben, diesen inkorporieren zu lassen, die Algen zu ernten und daraus das nunmehr markierte Lutein zu isolieren und die Einbaurate zu bestimmen.

Die Versuche wurden folgendermassen durchgeführt:

In zwei ersten Algenkulturen wurde die Wachstumsrate der Algen ermittelt sowie versucht, radioaktive [3-¹⁴C] HMG in einen, [4-¹⁴C] d,l -Valin im anderen Fall zu inkorporieren.

In zwei weiteren Kulturen wurde daraufhin versucht, die synthetisierte 3-d₃-HMG zu inkorporieren. Auch bei diesen Versuchen wurde zusätzlich radioaktive [3-¹⁴C] HMG zugesetzt, um auf einfache Art laufend die ungefähre Einbaurate ermitteln zu können.

Die Algen wurden jeweils in zwei 10 l-Fermentoren kultiviert, welche durch ein externes Umlauf-Thermostatenbad über Wärmeaustauscher aus Glasröhren geheizt oder gekühlt werden konnten. Ueber eine mit granulierter Aktivkohle gefüllte Glassäule wurde Frischluft eingeblasen. Um den Fermentor herum war als Lichtgürtel ein Aluminiummantel mit mehreren, einzeln einschaltbaren Fluoreszenzröhren angebracht. Ein kräftiger Elektromotor trieb das Rührgestänge an. Die Fermentoren waren zudem mit Oeffnungen für Flüssigkeitszugabe und Anschlüssen für die sterile Probeentnahme versehen. Die Anlage war von Bütikofer [74] entwickelt worden. Die

Methodik für die Algenkultur und die Isolation der Carotine wurden unverändert übernommen.

Die Fermentoren wurden vor dem Animpfen bei 120°C zusammen mit der Nährlösung während 20 Minuten autoklaviert. In regelmässigen Abständen von 24 Stunden wurde während des Wachstums der Algen die Populationsdichte mittels einer Thoma-Zelle unter dem Mikroskop ermittelt. Nach Zugabe der markierten HMG resp. des Valins war es sinnvoll, eine Methode zum Abschätzen der von den Algen aufgenommenen Menge des zugegebenen Substrats zu finden. Deshalb wurden anlässlich der täglichen Probeentnahmen Radioaktivitätsmessungen sowohl der klaren, durch Zentrifugation gereinigten Nährlösung als auch des entnommenen Gemisches aus Nährlösung plus Algen durchgeführt. Aus dem Quotienten der beiden Messungen konnte angenähert die prozentuale Verteilung des radioaktiven Substrats zwischen Nährlösung und Algen berechnet werden, wobei natürlich keine Information erhalten werden konnte, in welcher Form die radioaktive Substanz in den Algen vorhanden war und ob die Radioaktivität der Nährlösung auf noch nicht aufgenommene oder bereits metabolisierte und in anderer Form wieder ausgeschiedene Substanz zurückzuführen war (Details siehe im Exp. Teil). Nach Erreichen eines einigermaßen konstant bleibenden oder rückläufigen Verteilungskoeffizienten wurden die Algen durch Zentrifugation von der Nährlösung getrennt und lyophilisiert.

a) Algenkultur Nr. 1

Bei Erreichen einer Populationsdichte von ca. 2×10^7 Zellen/ml nach 9 Tagen wurde [$3\text{-}^{14}\text{C}$] HMG mit einer Totalaktivität von $50 \mu\text{C}$ zugegeben. Die Ernte der Algen erfolgte am 18. Tag bei einer Populationsdichte von ca. $4,5 \times 10^7$ Zellen/ml und einem Verteilungskoeffizienten von 60%.

b) Algenkultur Nr. 2

Bei Erreichen einer Populationsdichte von ca. 2×10^7 Zellen/ml nach

9 Tagen wurde $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ d,l-Valin mit einer Totalaktivität von $50\text{ }\mu\text{C}$ zugegeben. Die Ernte der Algen erfolgte am 17. Tag bei einer Populationsdichte von ca. $4,5 \times 10^7$ Zellen/ml und einem Verteilungskoeffizienten von 82%.

c) Algenkultur Nr. 3

Bei Erreichen einer Populationsdichte von 10^6 Zellen/ml nach 2 Tagen wurde $1\text{ g } [3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ HMG sowie $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ HMG mit einer Totalaktivität von $50\text{ }\mu\text{C}$ zugegeben. Nach 7 Tagen wurde nochmals $1\text{ g } [3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ HMG nachdosiert. Die Ernte der Algen erfolgte am 16. Tag bei einer Populationsdichte von 5×10^7 Zellen/ml und einem Verteilkoeffizienten von 72%. Bei dieser Kultur wurde eine starke Schwankung des Verteilkoeffizienten beobachtet. 6 Tage nach Zugabe der radioaktiven Substanz betrug er 62,8% und pendelte dann zwischen 39,5 und 72% hin und her.

d) Algenkultur Nr. 4

Bei Erreichen einer Populationsdichte von 10^6 Zellen/ml nach 2 Tagen wurde $1\text{ g } [3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ HMG mit einer Totalaktivität von $50\text{ }\mu\text{C}$ zugegeben. Die Ernte der Algen erfolgte am 16. Tag bei einer Populationsdichte von 5×10^7 Zellen/ml und einem Verteilkoeffizienten von 47,6%. Der Verteilkoeffizient bei dieser Kultur war etwas stabiler, sank aber immerhin innert der letzten drei Kulturtage von 68,6% auf 47,6%.

2.2.2. Isolierung der Carotinoide

Die Carotinoide wurden aus den Trockenzellen mit Methanol/Aether (3:1) extrahiert und in methanolischer KOH verseift. Nach der Epiphasen-Hypophasentrennung wurde die Hypophase an MgO mit Petroläther/Isopropanol (10:1) chromatographiert und die unpolarste Zone (= Lutein) isoliert und bis zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert.

2.2.3. Ergebnisse der Radioaktivitätsmessungen

a) Algenkulturen Nr. 1 und 2

Wie weiter oben erwähnt, hatten die Algenkulturen 1 und 2 den Zweck, Hinweise zu liefern, ob und in welchem Masse radioaktiv markierte Terpenvorläufer inkorporiert werden können. Es zeigte sich, dass sowohl $[4-^{14}\text{C}]$ Valin als auch $[3-^{14}\text{C}]$ HMG von den Algen aufgenommen werden konnten. Vergleicht man aber das Verhältnis der eingesetzten zu der im extrahierten Lutein wiedergefundenen Radioaktivität (wobei zur Berechnung der Impulsausbeute die chemische Ausbeute der ersten Kristallisation mit der Zählrate der letzten Kristallisation multipliziert wurde), so findet man gesamthaft im Fall der HMG 1,95‰, im Fall des Valins 0,88‰ der total eingesetzten Radioaktivität im Lutein wieder. Die Molverhältnisse isoliertes Lutein/ eingesetzte HMG resp. Lutein/Valin betragen 44,5 und 97,8, d.h. die Carotinvorläufer waren stark im Unterschuss vorhanden. Dennoch blieben rund 40% der Radioaktivität in der Nährlösung zurück oder wurden wieder in diese ausgeschieden. Rund 10-20% blieben in der alkalischen Phase nach der Verseifung. Leider ist unbekannt, welche andere Substanzen und in welcher Menge diese von den Algen ausser den Carotinoiden ebenfalls aus HMG oder Valin synthetisiert wurden. Aus den Messungen geht deshalb auch nicht hervor, ob die gemessene prozentuale Einbaurate einer echten Verteilung der radioaktiven Vorläufer zwischen verschiedenen möglichen Folgeprodukten entspricht, oder ob die schlechte Einbaurate einzig oder teilweise z.B. auf mangelnde Zellmembranpermeabilität zurückzuführen ist, wie z.B. im Falle von MVA in Chlorella pyrenoidosa [13]. Andere Gründe könnten auch ein ungünstiger Zeitpunkt des Zufügens der Substrate gewesen sein oder das Fehlen von bestimmten notwendigen Cofaktoren.

b) Algenkulturen Nr. 3 und 4

Interessanter waren deshalb die Ergebnisse der Algenkulturen Nr. 3 und 4, bei welchen in Form von deuterierter HMG bezüglich der molaren Ausbeute an Lycopin ein Ueberschuss an Vorläufer angeboten

wurde (allfällige andere gebildete Produkte nicht berücksichtigt). In Kultur 3 wurden am 3. und am 8. Tag je 1 g, in Kultur 4 nur am 3. Tag 1 g $[3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ HMG zugegeben, die erste Zugabe wiederum zusätzlich mit je 50 μC $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ HMG. Zu Kultur 3 wurden auch 10 mg CoA gegeben. Rein theoretisch könnte ein geeignetes, biologisches System aus 1 g HMG (6,06 mMol) maximal 430 mg (0,76 mMol) Lycopin erzeugen, falls keine anderen Produkte gebildet würden.

Aus den Algenkulturen 3 und 4 wurden 62 und 52,8 mg Lutein isoliert, von der eingesetzten Radioaktivität wurden 1,32 und 1,67%o im Lutein wiedergefunden. Diesbezüglich ist also kaum ein Unterschied zu den Kulturen 1 und 2 festzustellen, obwohl das Molverhältnis Lutein/HMG 0,009 und 0,015 beträgt. Trotz des viel grösseren Angebots an Substrat wurde also weder eine wesentlich grössere noch eine kleinere Einbaurate festgestellt, letztere z.B. infolge der "Verdünnung" der radioaktiven HMG durch die im Uebermass vorliegende deuterierte. Es scheint also, dass die prozentual berechnete Einbaurate doch eher einem echten Verteilverhältnis zwischen verschiedenen möglichen Biogeneseprodukten entspricht. Nimmt man der Einfachheit halber an, dass die rund 1,5%o in Lutein inkorporierte $[3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ HMG pro Lutein-Molekül an allen 8 Terpen-einheiten gleichmässig vorkommen würde, müssten 0,65 mg des isolierten Luteins an 8 Methylgruppen perdeuteriert sein. So gerechnet wäre 1% des isolierten Luteins gezielt mit Deuterium markiert. Diese Einbaurate ist jedoch viel zu klein, als dass im ^1H -NMR.-Spektrum eine Intensitätsabnahme des Signals der einen der geminalen Methylgruppen des ϵ -Rings gegenüber der anderen festgestellt werden könnte.

Tatsächlich wies das NMR.-Spektrum des isolierten Luteins keinen Unterschied auf zu einem Spektrum von Lutein anderer Herkunft. Auch durch eine Mikroanalyse konnte kein messbarer Anteil an Deuterium festgestellt werden.

2.3. Inkorporationsversuche in Speisekürbis

2.3.1. Versuchsdurchführung

Es wurde auch versucht, $[3',3',3'-^2\text{H}_3]$ HMG in Kürbisse der Sorte "Orange Knirps" (Orange Boy) zu inkorporieren. 102 Tage nach der Aussaat wurde an 8 Kürbissen je 1 ml einer 10proz. Lösung von $[3',3',3'-^2\text{H}_3]$ HMG in Form des Kaliumsalzes ins Fruchtfleisch in der Nähe des Stengels eingespritzt. Die Ernte der Kürbisse erfolgte 126 Tage nach der Aussaat. Das Nassgewicht der einzelnen Früchte betrug zwischen 400 g und 2,1 kg, das Trockengewicht nach dem Lyophilisieren noch etwa 1/6 bis 1.8. An der Einstichstelle war bei den meisten Früchten eine bräunliche Verfärbung und im Fruchtfleisch darunter ein Ansatz zur Fäulnis sichtbar. Nach Extraktion mit Methanol, Herauswaschen der Zucker aus der ätherischen Lösung, Verseifung und Chromatographie an $\text{Mg}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3 \cdot \text{Si}_2$ nach [75] wurde aus total ca. 1300 g Trockensubstanz 11 mg Lutein kristallin erhalten. Wiederum war weder durch eine Mikroanalyse Deuterium feststellbar noch wurde ein Effekt im ^1H -NMR.-Spektrum beobachtet.

2.4. Folgerungen aus den Inkorporationsversuchen

Die negativen Ergebnisse der Inkubationsversuche bewogen uns, nach ganz neuen Wegen zu suchen. Es schien wenig wahrscheinlich, dass Inkorporationsversuche mit anderen Substanzen an ähnlichen biologischen Systemen zu besseren Einbauraten führen würden. Für NMR.-Beobachtungen wären 20-100% Markierungsgrad wünschenswert. Substrate kürzerer Struktur hätten zwar wegen der Zellmembranpermeabilität eine grössere Chance, in ein Carotingerüst inkorporiert zu werden; allerdings könnte dieses weniger selektiv markiert werden.

Es war deshalb naheliegend, grössere Carotinoid-Vorläufer zu verwenden und dafür zellfreie Enzymsysteme in Betracht zu ziehen. So schien z.B. Lycopin, welches an je einer der geminalen Methylgruppen stereoselektiv markiert ist, sehr geeignet zu sein für biologi-

sche Cyclisierungsversuche in vitro, wenn es einerseits gelingt, z.B. mit Extrakten aus Tomatenplastiden die zur Cyclisierung von Lycopin zu Carotinen mit β - und/oder ϵ -Endgruppen notwendigen Enzyme zu isolieren [76], und wenn andererseits ringgeschlossene Carotine mit β - und/oder ϵ -Endgruppen, bei welchen jeweils eine der beiden geminalen Methylgruppen ebenfalls stereoselektiv deuteriert ist, als Vergleichssubstanz zur Verfügung stehen [77, 78, 56].

IV. Bisherige in vitro-Cyclisierungen mit Zellextrakten

In vitro-Biosynthesen oder -umwandlungen von Carotinoiden mit Zellextrakten wurden schon mehrfach durchgeführt. So konnten Bramley und Davies [79, 80] mit Zellextrakten von Phycomyces blakesleeana [2-¹⁴C] MVA in β -Carotin inkorporieren. Jungalwala und Porter [37] synthetisierten mit Extrakten aus Tomatenplastiden Phytoin aus IPP und FPP. Mehreren Autoren gelang die Umwandlung von Lycopin in β -Carotin. Porter benutzte Extrakte aus Tomaten [81] oder Spinat [82, 83]. Der erzielten Ausbeute wegen hervorzuheben und für unsere Zwecke als am geeignetsten anzusehen sind die Arbeiten von Hill et al. [84], welchen es gelang, mit Extrakten aus Plastiden aus Samen von Phaseolus vulgaris (French bean, Stangenbohnen) oder aus Tomaten eine Umwandlung von [15,15'-³H₂] Lycopin in bis zu 12,9% Konversionsausbeute (bezüglich Radioaktivität) zu erreichen. Könnte mit dieser Methode 100% des angebotenen Lycopin in β -Carotin umgewandelt werden, wäre der erreichte Isotopengehalt in β -Carotin rel. zu Lycopin ca. 30%.

Selbstverständlich muss im cyclisierten Carotin die Stellung der mit Deuterium markierten Methylgruppen eindeutig analysiert werden können. Durch eine stereoselektive Synthese wurde gezeigt [77, 78], dass bei β,β -Carotin mit stereoselektiv markierten geminalen Methylgruppen infolge der Isotopen-Chiralität ein signifikantes Tieftemperatur CD.-Spektrum bei -180°C zu erwarten ist. β,ϵ -Carotin mit selektiver Deuteriumsmarkierung an einer der geminalen Methylgruppen des ϵ -Rings kann bei genügender Markierung ($\geq 20\%$) bereits im ¹H-NMR.-Spektrum aufgrund der chemischen Verschiebung der Methylsignale analysiert werden, ansonsten im ²H-NMR.-Spektrum. Somit sind eine eindeutige Identifikation sowie Rückschlüsse auf die Stereochemie bei der Cyclisierung von Lycopin möglich.

V. Bisherige Synthesen deuterierter Carotine

Die bisherigen chemischen Synthesen deuterierter Carotine hatten vor allem zum Zweck, Kenntnisse über das massenspektrometrische Fragmentierungsverhalten von Carotinoiden zu liefern. Biosynthesen von deuterierten Carotinen oder deren Vorläufer dienten vorwiegend dazu, Aufschluss über Verlust oder Verbleib von diastereotopen Protonen der Mevalonsäure während der Biogenese zu erhalten.

1. Biosynthesen deuterierter Carotinoide

Cornforth et al. [85] entwickelte verschiedene spezifische Synthesen für Mevalonsäure, bei welcher jedes Wasserstoffatom an den prochiralen Zentren C(2), C(4) und C(5) stereospezifisch durch Deuterium oder Tritium ersetzt werden konnte. Durch Biogenese-Experimente mit Hefe von Popiak [86] und von Goodwin [87, 88] konnte damit das Schicksal jedes diastereotopen Protons der MVA in der Biogenesefolge bis zum Lycopin verfolgt werden.

Spezifisch an C(2) deuteriertes β,β -Carotin konnten Britton et al. [89, 88] erhalten, indem sie im Dunkeln gewachsene Zellen von Scenedesmus obliquus, welche unter diesen Bedingungen nur ψ -Carotin bildeten, in D_2O umsetzten und belichteten. Damit konnte auch gezeigt werden, dass zur Cyclisierung an C(2) ein Proton aus D_2O aufgenommen wurde.

Durch Zugabe von Nicotin, einem Carotin-cyclasehemmer, zu Zellen einer Flavobacterium-Species konnten McDermott et al. [90] die Carotinproduktion auf der Stufe des Lycopins (mit viel Nicotin) resp. des Rubixanthins (mit wenig Nicotin) stoppen. Nach dem Entfernen des Nicotins durch Auswaschen und Resuspendieren der Zellen in D_2O wurde das bereits gebildete Lycopin unter aeroben Bedingungen in $[2,2'\text{-}^2H_2]$ Zeaxanthin umgewandelt [87]. Anaerobe Bedingungen führten zu entsprechendem β,β -Carotin.

Bereits 1961 hatten Strain et al. [91] perdeuteriertes, kristallines Lycopin, β,β -Carotin, Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin aus den

Grünalgen Scenedesmus obliquus und Chlorella vulgaris isoliert, welche sie in 99,6% D_2O kultivierten. Die Versuche wurden zwecks Feststellung von Unterschieden in den UV./VIS. - und IR. -Spektren der perdeuterierten und der undeuterierten Carotinoide durchgeführt.

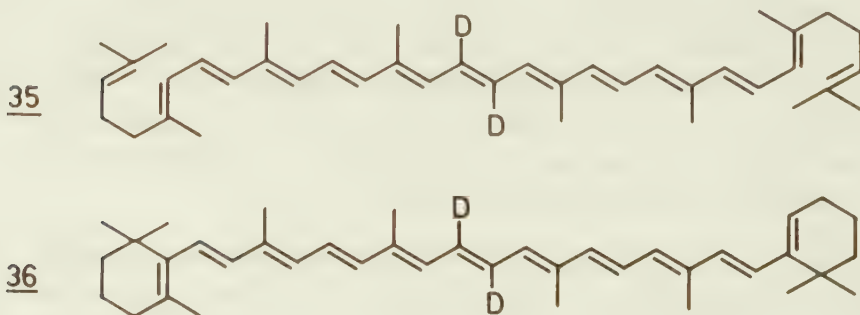
2. Chemische Synthese deuterierter Carotine

Brzezinka et al. geben in [92] verschiedene Methoden an zur Synthese der verschiedensten deuterierten Carotine. Da alle anderen Autoren, welche sich mit der Deuterierung von Carotinen beschäftigten, sich ebenfalls derselben Reaktionen bedienten, werden im folgenden die einzelnen Synthesen ungefähr gemäss der Zusammenstellung der Reaktionstypen in [92] besprochen, unter Berücksichtigung der neueren Arbeiten.

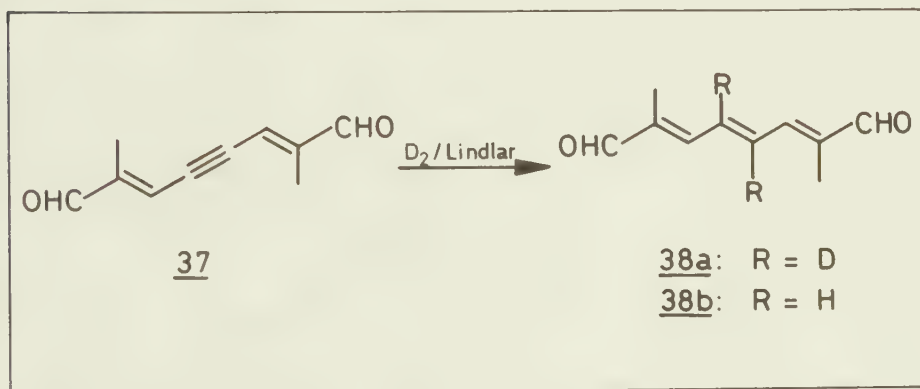
2.1. Reduktion von Alkinen mit D_2 und Lindlar-Katalysatoren

Mit D_2 und Lindlar-Katalysatoren können Alkine zu Alkenen reduziert werden. Für Carotine ist dies jedoch nur für Dreifachbindung zwischen C(11)/C(12), C(11')/C(12') sowie C(15)/C(15') durchführbar, weil die entstehende (Z)-Doppelbindung zwischen C(7) C(8) resp. C(7') C(8') eine zu starke Wechselwirkung zwischen der Methylgruppe an C(9) ($CH_3(19)$) und dem Jononring hervorrufen würde.

Aus den entsprechenden Dehydroverbindungen stellten Schwieter et al. [93] $[15,15'-^2H_2]$ Lycopin (35) und $[15,15'-^2H_2]$ 8,8-Carotin (36) her.

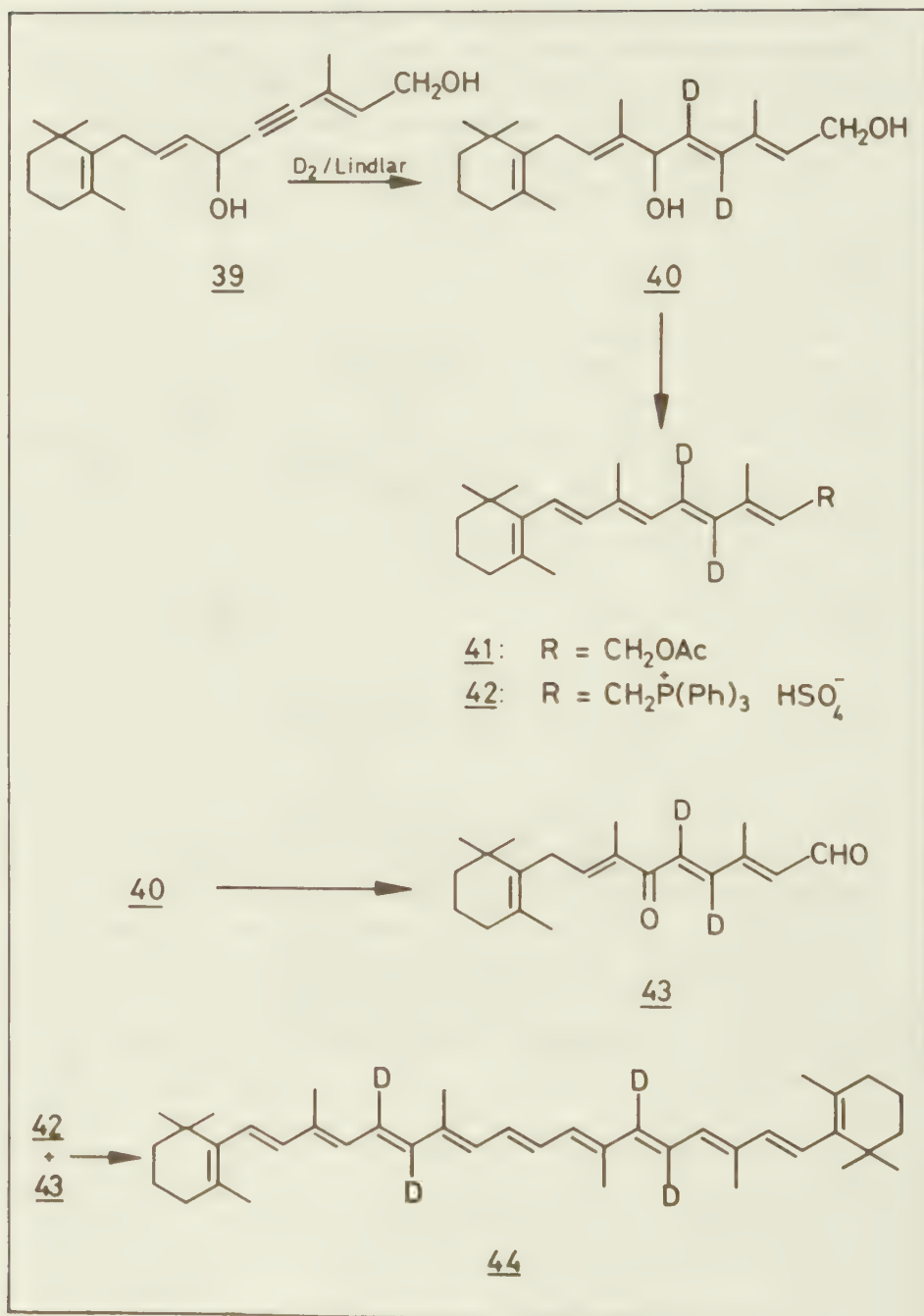


2,7-Dimethyl-octa-2,6-dien-4-in-1,8-dial (37), ein in der technischen Carotinsynthese häufig gebrauchtes Synthion ("C₁₀-Dialdehyd") [94, 95], lässt sich mit D₂ und Lindlar-Katalysator zum symmetrischen deuterierten Dialdehyd 38a reduzieren (Schema 12). Kombination dieses Synthions mit anderen deuterierten Molekülteilen in der Folgesynthese führt zu mehrfach deuterierten Carotinen (z.B. 50c, 75, 80, 85b [92]).



Schema 12

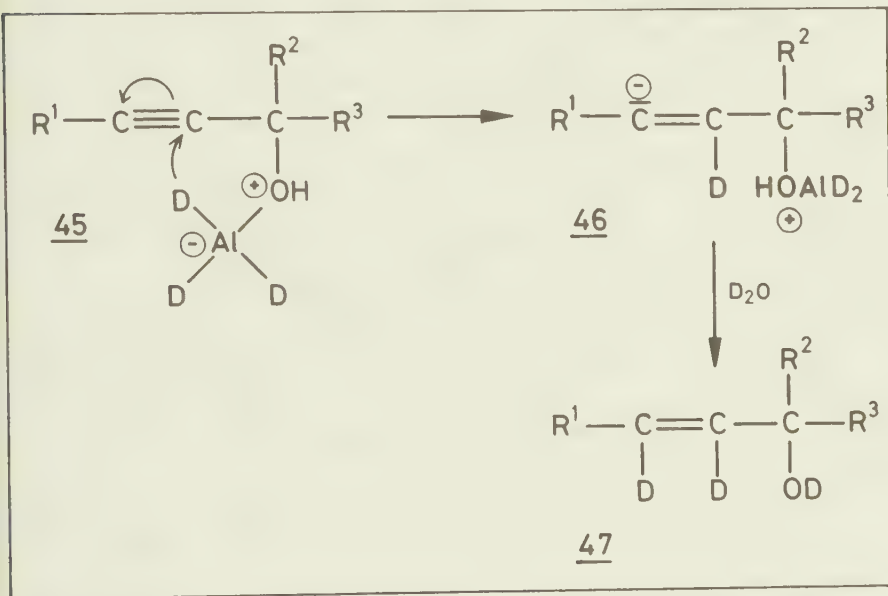
1,6-Dioxy-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)-nona-2,7-dien-4-in (39), hergestellt aus β -Jonon nach Isler [96, 97] liefert nach Hydrierung mit D₂ und Lindlar-Katalysator den Dialkohol 40. Daraus kann [11,12-²H₂] Vitamin A-acetat (41), das Wittig-Salz 42 und durch Oxidation mit MnO₂ der Ketoaldehyd 43 dargestellt werden. Verknüpfung von 42 und 43, Reduktion der Ketogruppe mit NaBH₄ und Behandeln mit HBr ergibt [11,11',12,12'-²H₄] β , β -Carotin (44) [92] (Schema 13).



Schema 13

2.2. Reduktion von α -Hydroxyalkinen mit LiAlH_4 oder LiAlD_4

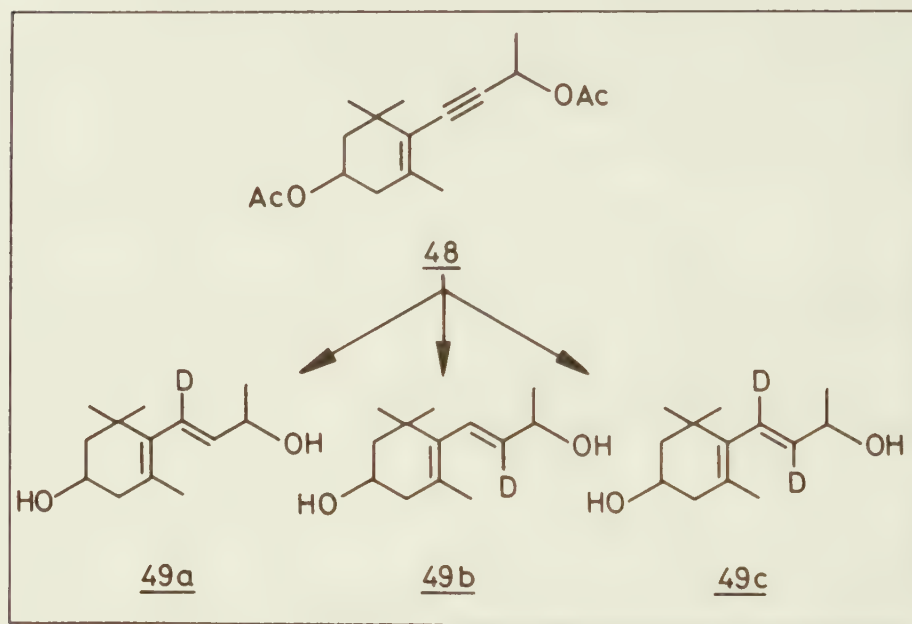
LiAlH_4 resp. LiAlD_4 reduziert α -Hydroxyalkine leicht und spezifisch. Die Reduktion verläuft wie in Schema 14 dargestellt [92]. Bei Verwendung von LiAlD_4 wird ein Deuteriumatom in α -Stellung zur OH-Gruppe eingeführt, und die Hydrolyse mit D_2O führt zu einer Isotopensubstitution in β -Stellung. Auf diese Weise kann entweder die α - oder die β -Stellung einzeln oder beide zusammen deuteriert werden.



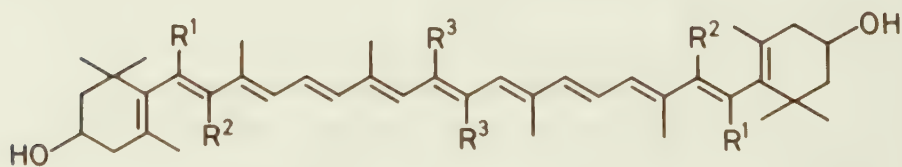
Schema 14

2-Acetoxy-4-(4-acetoxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)-but-3-in (48), hergestellt aus Isophoron nach Isler et al. [98] und Loeber et al. [99] wurden durch geeignete Wahl der Reduktionsmittel und der Aufarbeitungsmethode die drei deuterierten Ionole 49a, 49b und 49c erhalten. Nach Oxidation mit MnO_2 , Umsetzen mit Vinylmagnesiumbromid zu den entsprechenden Wittigsalzen nach [99] wurde nach der Verknüpfung entweder mit dem undeuterierten oder dem deuterierten C_{10} -Dialdehyd 38b resp. 38a [$7,7'\text{-}^2\text{H}_2$] Zeaxanthin (50a),

[7,7',8,8'- $^2\text{H}_4$] Zeaxantin (50b) und [8,8',15,15'- $^2\text{H}_4$] Zeaxanthin (50c) erhalten.



Schema 15



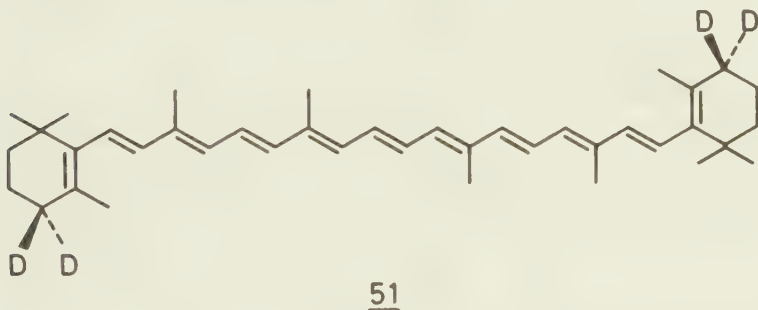
50a: $\text{R}^1 = \text{D}$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$

50b: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{D}$, $\text{R}^3 = \text{H}$

50c: $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{D}$

2.3. Reduktion von allylständigen Ketogruppen mit $\text{LiAlD}_4/\text{AlCl}_3$

Allylständige Carbonylgruppen lassen sich in Gegenwart von AlCl_3 durch LiAlD_4 zur $-\text{CD}_2$ -Gruppe reduzieren. β,β -Carotin kann in 4- und 4'-Stellung deuteriert werden zu $[4,4,4',4'-^2\text{H}_4]$ β,β -Carotin (51) durch Oxidation zu Canthaxanthin [100, 101] und anschliessender Reduktion mit $\text{LiAlD}_4/\text{AlCl}_3$.



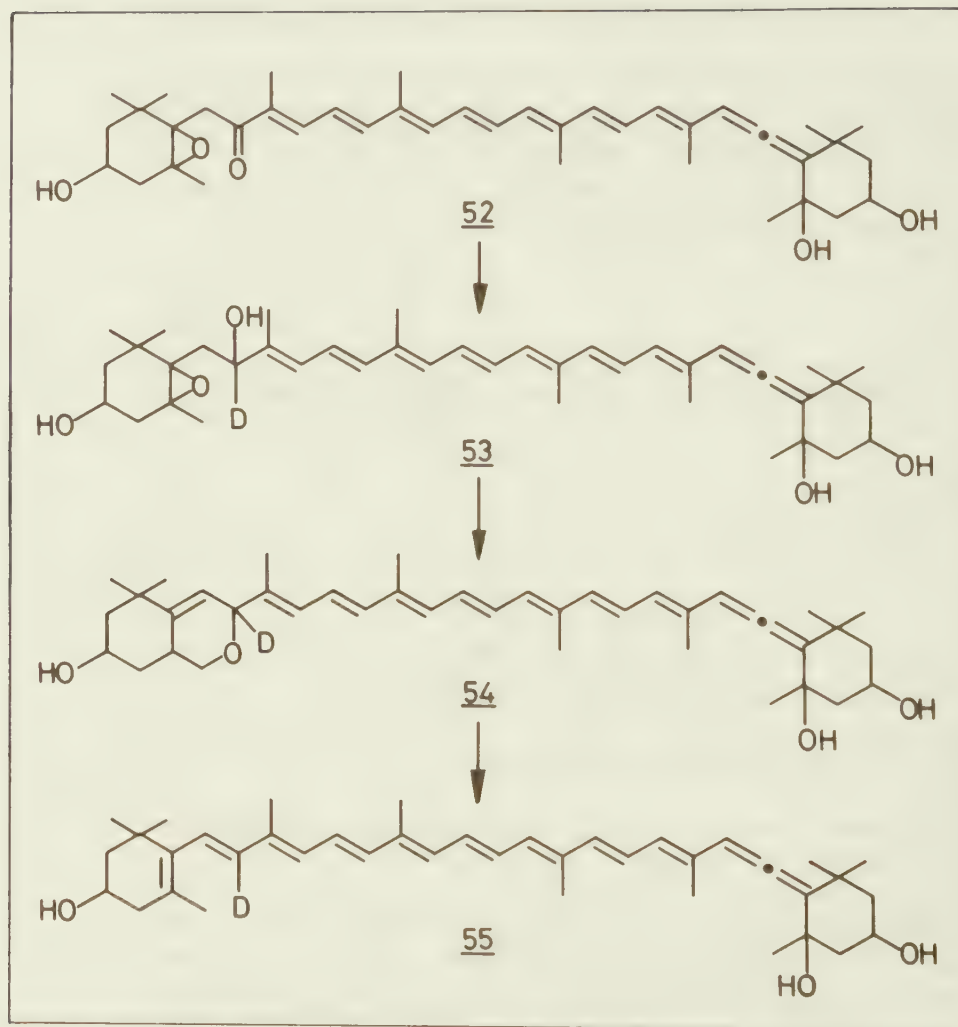
Auf der Stufe von Cyclocitral lässt sich die 4-Stellung auch durch eine Austauschreaktion deuterieren (siehe Kap. II. 8.)

2.4. Reduktion von Ketogruppen mit LiAlD_4

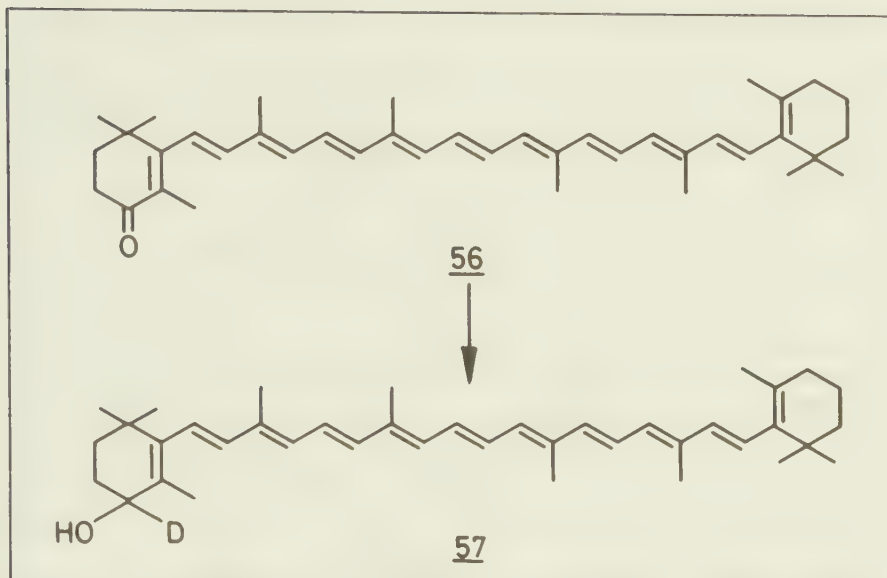
Ohne Zusatz von AlCl_3 verläuft die Reduktion von Ketogruppen nur bis zur Stufe des Alkohols.

Budzikiewicz et al. [102] reduzierten Fucoxanthin (52) mit LiAlD_4 zu $[8-^2\text{H}]$ Fucoxanthol (53), wandelten dieses mit CHCl_3/HCl unter Wasserabspaltung in das furanoide Epoxid $[8-^2\text{H}]$ Fucochrom (54) um und erhielten durch Reduktion mit LiAlH_4 daraus $[8-^2\text{H}]$ Zeaxanthin (55) (Schema 16).

Dieselben Autoren [102] reduzierten Echinenon (56) mit LiAlD_4 zu $[4-^2\text{H}]$ Isokryptoxanthin (57) (Schema 17).



Schema 16



Schema 17

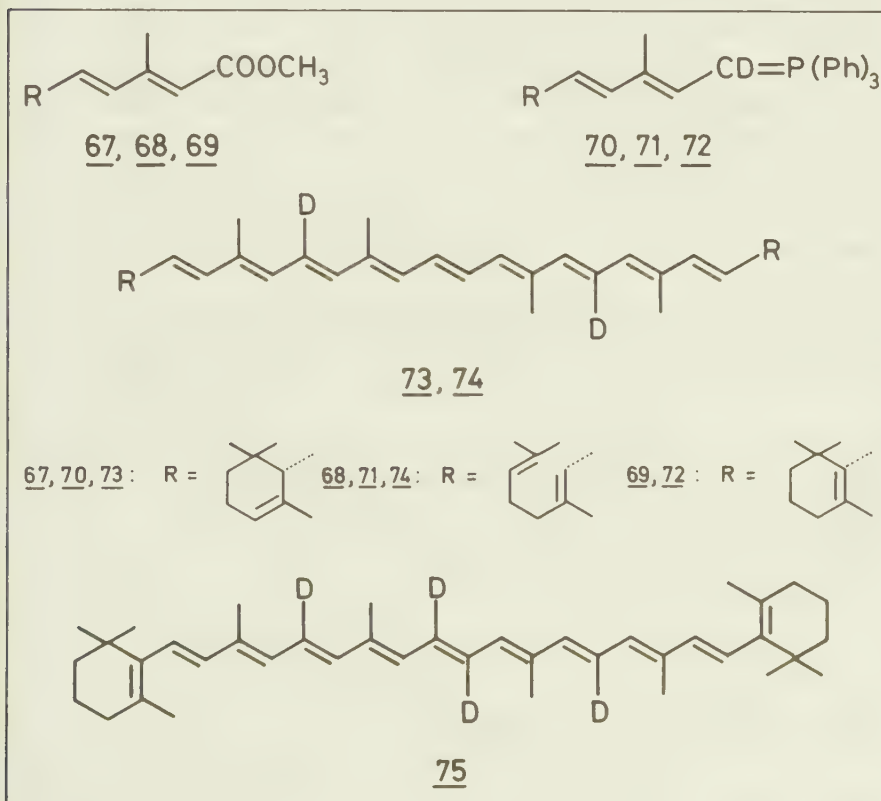
2.5. Reduktion von allylischen Carbonsäuren und -estern mit LiAlD_4 ; Verwendung von ^2H -markierten Wittigsalzen

Allylische Carbonsäuren und -ester liefern bei der Reduktion mit LiAlD_4 ^2H -markierte Alkohole des Typs $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CD}_2\text{OH}$. Diese lassen sich entweder zu Aldehyden oxydieren oder in Wittigsalze überführen.

Bei der Verwendung von Wittigsalzen, bei welchen die zur Triphenylphosphoniumgruppe α -ständigen Protonen durch Deuterium ersetzt sind, muss beachtet werden, dass in Gegenwart von Basen wie KOH in CH_3OH oder des manchmal verwendeten 1,2-Epoxybutans die baseninduzierte α -Eliminierung teilweise reversibel ist und ^2H gegen ^1H ausgetauscht wird, zumal ein grosser Ueberschuss an austauschbarem Wasserstoff (CH_3OH) vorhanden ist. Mit Butyllithium und Aether werden 20-50% ^2H gegen ^1H ausgetauscht [103, 104]. Der Verlust an Deuterium kann unter 10% gehalten werden durch Ein-

setzen von CH_3OD und KOD . Umgekehrt ist es möglich, durch Austauschreaktion Deuterium in Gegenwart von KOD und CH_3OD in vorher unmarkierte Wittigsalze einzuführen.

Durch Reduktion der entsprechenden C_{10} -Carbonsäuren mit LiAlD_4 stellten Kj sen et al. [103] die Wittigsalze 58, 59 und 60 her und erhielten durch Umsetzen mit Crocetindialdehyd die bicyclischen Arylcarotine [$7,7'\text{-}^2\text{H}_2$] Renierapurpurin (61) und [$7,7'\text{-}^2\text{H}_2$] Isorenieratin (62) sowie [$7,7'\text{-}^2\text{H}_2$] Lycopin (63), 1-Methoxy-2-dihydro- $[\text{7,7'}\text{-}^2\text{H}_2]$ Lycopin (64) und [$7,7'\text{-}^2\text{H}_2$] 3,4,3',4'-Tetrahydrospirilloxanthin (65). Allein durch die baseninduzierte Austauschreaktion in $\text{CH}_3\text{OD}/\text{CH}_3\text{OLi}$ auf der Stufe der Wittigsalze synthetisierten Johansen et al. [105] [$7,7'\text{-}^2\text{H}_2$] Lycopin (63), [$7,7'\text{-}^2\text{H}_2$] Rhodopin (66) und [$7,7'\text{-}^2\text{H}_2$] Apo-8'-Lycopinal mit 80-90% Deuteriumeinbau (Schema 18).



Schema 19

Durch LiAlD_4 -Reduktion der C_{15} -Carbonsäureester 67 und 68, hergestellt aus α -Jonon und Pseudojonon, wurden von Eidem und Jensen [106] die deuterierten Ylide 70 und 71 mit Butyllithium in absolutem Aether dargestellt. Verknüpfung mit undeuteriertem C_{10} -Dialdehyd 34b lieferte $[11,11'\text{-}^2\text{H}_2]$ ϵ,ϵ -Carotin (73) und $[11,11'\text{-}^2\text{H}_2]$ Lycopin (74) mit 87 und 80% Deuteriumeinbau (Schema 19).

Brzezinka et al. [92] stellten das Ylid 72 in CH_3OD mit KOD her und verknüpften dieses mit dem deuterierten C_{10} -Dialdehyd 34a, wobei sie $[11,11',15,15'\text{-}^2\text{H}_4]$ β,β -Carotin (75) erhielten (Schema 19).

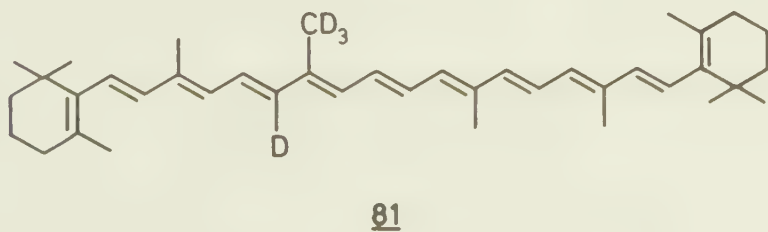
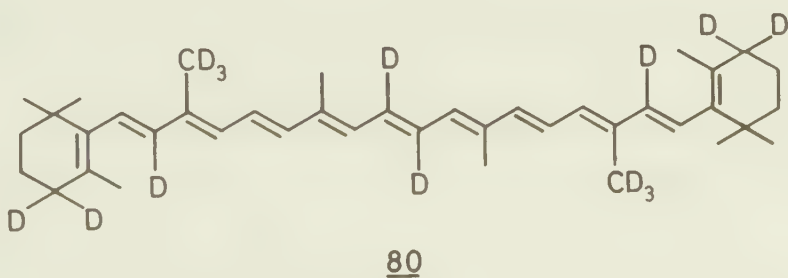
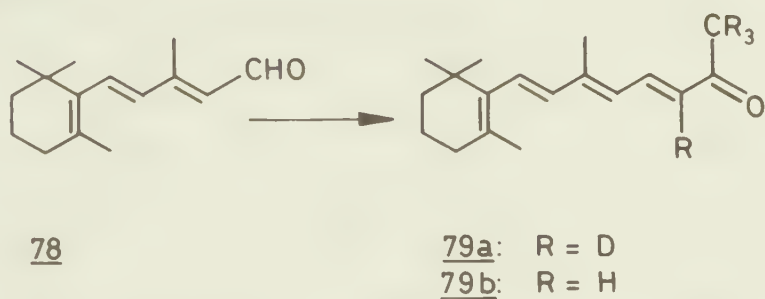
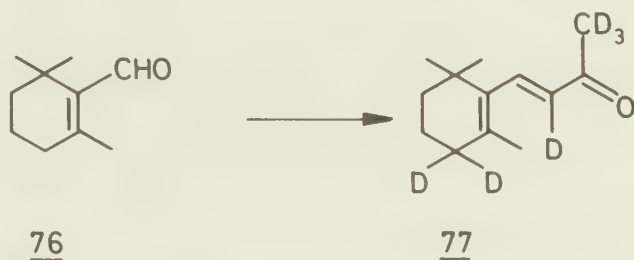
2.6. Aldolkondensationen von $[^2\text{H}_6]$ Aceton mit ungesättigten Aldehyden

Mit $[^2\text{H}_6]$ Aceton lassen sich mittels einer Aldolkondensation mit Cyclocitral (76) oder dem C_{15} -Aldehyd 78 gemäss Schema 20 CD_3 -Gruppen in die Kette von Carotinen einführen [92]. Bei Verwendung von Cyclocitral werden infolge Enolisierung auch die zur Aldehydgruppe γ -ständigen Protonen an $\text{C}(4)^{1)}$ gegen Deuterium ausgetauscht, nicht aber diejenigen an der Methylgruppe an $\text{C}(5)^{1)}$. Ebenso erfolgt in jedem Fall ein Deuteriumeinbau an den C-Atomen $\text{C}(8)$, $\text{C}(8')$, resp. $\text{C}(12)$, $\text{C}(12')^{1)}$ aus der zweiten Deuteromethylgruppe des $[^2\text{H}_6]$ Acetons. Zur Deuterierung von CH_3 (19) allein siehe Kap. V.2.8.

Das Wittigsalz aus 77 wurde analog der Synthese von 48 (Kap. V.2.2.) hergestellt. Verknüpfung mit dem deuterierten C_{10} -Dialdehyd 34a ergab $[4,4,4',4',8,8',19,19,19,19',19',19'\text{-}^2\text{H}_{14}]$ β,β -Carotin (80) [92].

Durch eine Grignard-Reaktion mit Vinylmagnesiumbromid wurde das C_{18} -Keton 79a unter Umlagerung des entstandenen Allylalkohols ins Wittigsalz überführt und mit Vitamin-A-Aldehyd verknüpft zu $[12,20,20,20\text{-}^2\text{H}_4]$ β,β -Carotin (81) [92].

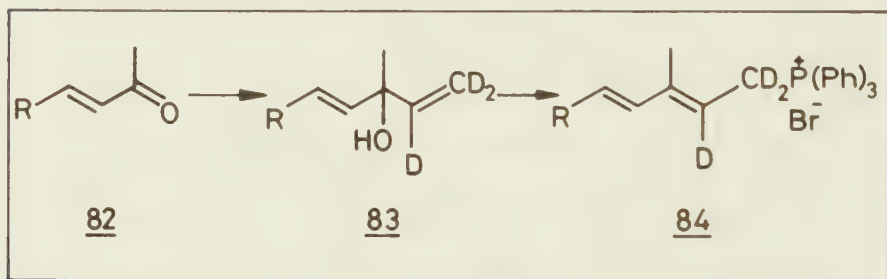
1) Numerierung gemäss Carotin-Nomenklatur



Schema 20

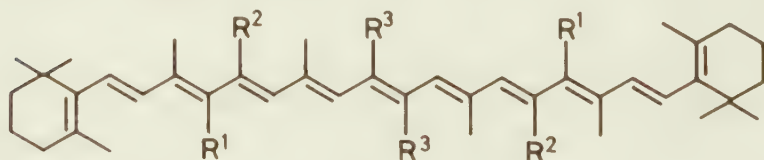
2.7. Grignardreaktionen von Ketoverbindungen mit Deuterovinylmagnesiumbromid

Nach [107] kann aus [1,1,2,2- $^2\text{H}_4$] 1,2-Dibromäthan [$^2\text{H}_3$] Vinylmagnesiumbromid hergestellt werden, welches gemäss Schema 21 die Verlängerung einer Polyenkette 82 um eine ^2H -markierte C_2 -Einheit erlaubt, nachdem eine Allylumlagerung durchgeführt und das Wittigsalz 84 hergestellt worden ist.



Schema 21

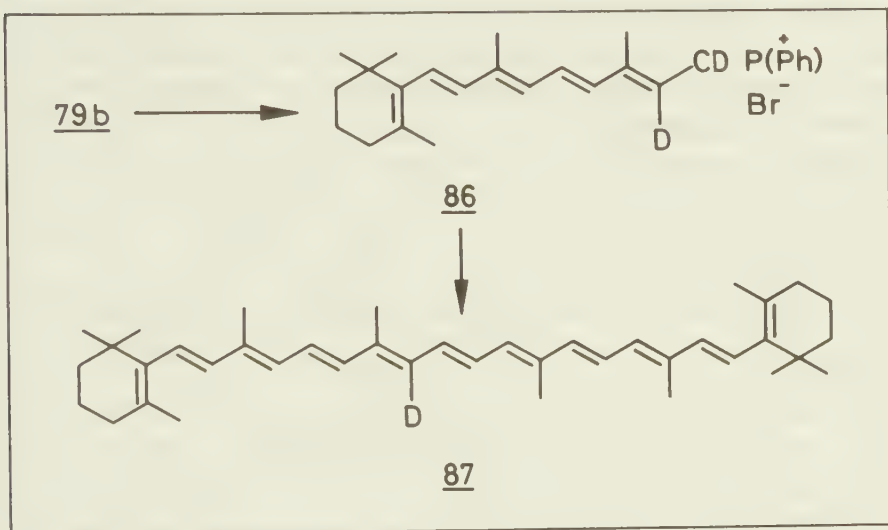
Diese Reaktion wurde von Brzezinka et al. [92] an β -Jonon durchgeführt. Verknüpfung mit undeutertem C_{10} -Dialdehyd 34b durch Erhitzen in 1,2-Epoxybutan führte zu [10,10'- $^2\text{H}_2$] β,β -Carotin (85a), weil die zur Phosphoniumgruppe α -ständige Markierung vollständig ausgetauscht wurde. In Gegenwart von CH_3OD und KOD wurde mit dem deuterierten C_{10} -Dialdehyd 34a [10,10',11,11',15,15'- $^2\text{H}_6$] β,β -Carotin (85b) erhalten.



85a: $\text{R}^1 = \text{D}$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$

85b: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{D}$

Reaktion des C_{18} -Ketons 79b mit 2H_3 Vinylmagnesiumbromid ergab mit Triphenylphosphinhydrobromid das Wittigsalz 86. Verknüpfung desselben mit Vitamin-A-aldehyd in CH_3OH/KOH führte zum Verlust der zwei α -ständigen Deuteriumatome und lieferte $[14-^2H]$ β,β -Carotin (87) mit 95% Deuteriumeinbau [92].



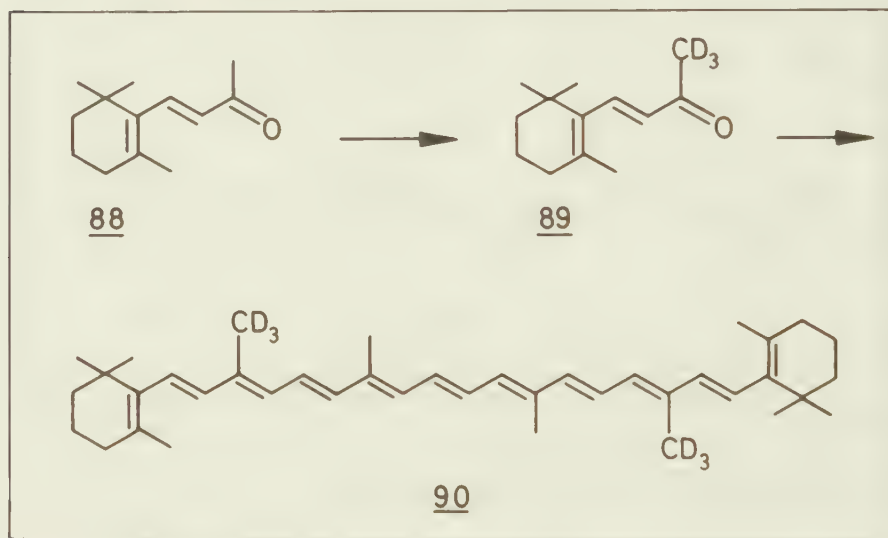
Schema 22

2.8. Deuteriumeinbau durch Austauschreaktion

Bereits bei der Besprechung der Synthesen unter Verwendung 2H -markierter Wittigsalze (Kap. V.2.5.) wurde darauf hingewiesen, dass in basischem Milieu zur Triphenylphosphoniumgruppe α -ständige Protonen mit Protonen aus dem Lösungsmittel ausgetauscht werden und Deuterium auf diese Weise entweder eingeführt oder entfernt werden kann.

Ebenso ist es bei enolisierbaren Carbonylverbindungen möglich, in α -Stellung zur Carbonylgruppe durch basenkatalysierte Enolisierung Deuterium durch bloße Austauschreaktion einzuführen. Aus β -Jonon (88) stellten Johansen und Liaaen-Jensen [108] durch Behandeln mit D_2O/OD^- $[\alpha,\alpha,\alpha-^2H_3]$ β -Jonon (89) her. Durch Verlängerung um

eine C_2 -Einheit durch eine Horner-Reaktion mit Triäthylphosphonoacetat, Reduktion, Darstellung des entsprechenden C_{15} -Wittigsalzes und Verknüpfung desselben mit undeutertem C_{10} -Dialdehyd 34b gelangten sie zu $[19,19'-^2H_6]$ β,β -Carotin (90) (Schema 23). Allerdings wurde bei der Horner-Reaktion ein unerwünschter Deuteriumaustausch beobachtet. Dieser Schwierigkeit konnte ausgewichen werden durch Reduktion des deuterierten Jonons 89 zum entsprechenden Jonol, Bildung des Wittigsalzes mit $PPh_3 \cdot HBr$ und Verknüpfung desselben mit C_{14} -Dialdehyd.



Schema 23

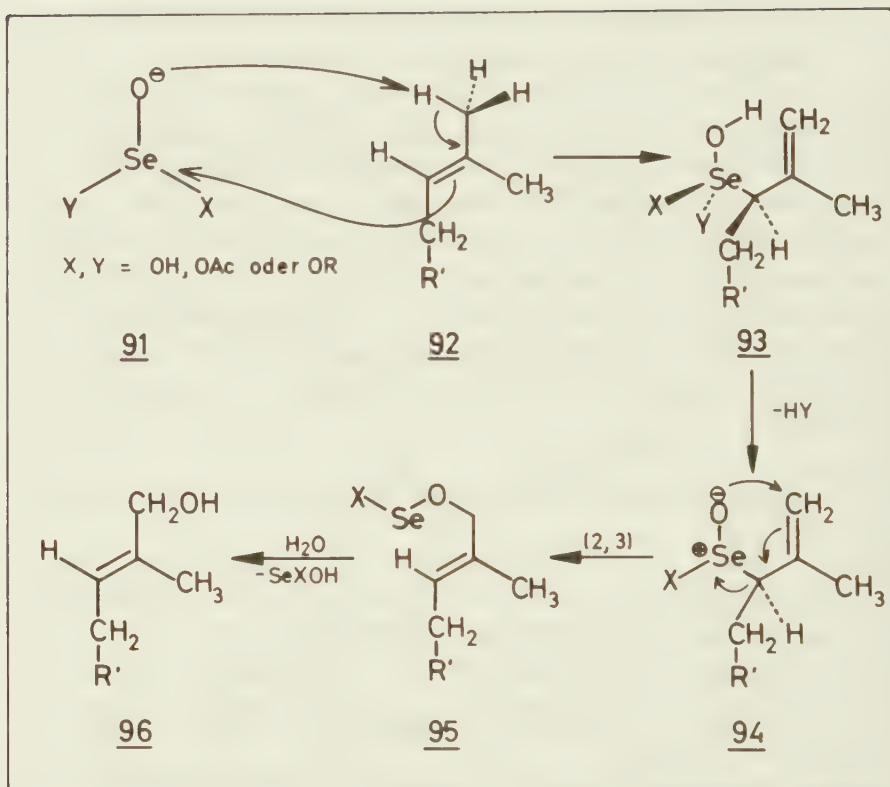
VI. Möglichkeiten der Funktionalisierung der Methylgruppen der Isopropyliden-Endgruppe

Die neue Aufgabe bestand also darin, das Carotin Lycopin im Hinblick auf spätere Cyclisationsversuche an einer der beiden geminalen Methylgruppen C(16) und C(16') oder C(17) und C(17') mit Deuterium zu markieren. Das Hauptproblem war zunächst die regio- und stereoselektive Funktionalisierung einer der beiden geminalen Methylgruppen in acyclischen Terpenen. In den folgenden Unterkapiteln ist ein Ueberblick gegeben über die verschiedenen Möglichkeiten der stereospezifischen Funktionalisierung von Isopropyliden-Endgruppen.

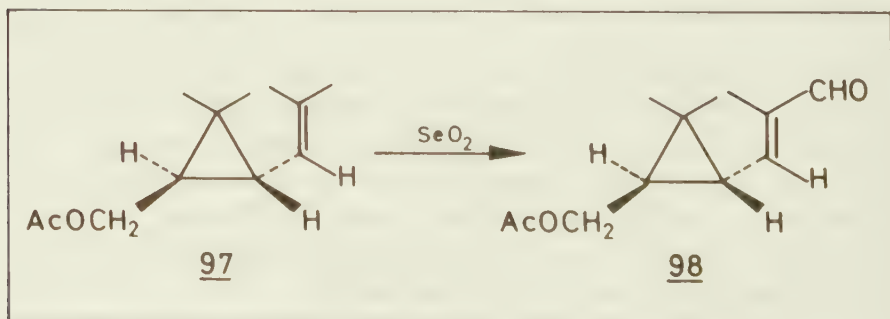
1. Stereospezifische Oxidation einer der beiden geminalen Methylgruppen

Die am längsten und zur Zeit der Problemstellung als einzige bekannte Methode war die Oxidation der (E)-ständigen Methylgruppe an C(7) von Geraniol mit SeO_2 [109]. Diese Reaktion ist vor allem von [110], [111] und [112] eingehend untersucht worden. SeO_2 resp. Selensäure oder Selensäureester (91) bildet mit einem Allylsystem 92 über eine sog. "En-Reaktion" allylische selenige Säure 93 (Schema 24). Eine schnelle [2,3H]-Verschiebung unter Abspaltung von HY und anschliessender Hydrolyse führt zum (E)-ständigen Allylalkohol 96.

Die SeO_2 -Oxidation an Terpenen wurde bereits 1959 von Clark et al. [113] an L-Citronellal-äthylenacetal durchgeführt. Bis in die neueste Zeit scheint es eine Standardmethode geworden zu sein, berichten z.B. Gaughan und Poulter 1979 [114] von der erfolgreichen Oxidation an (1R,3R)-Chrysanthemyl-3-acetat (97) (Schema 25), und van Tamelen und Marson [115] oxidierten Geranylbenzyläther zum Zwecke der Darstellung von Geranylgeraniol.



Schema 24

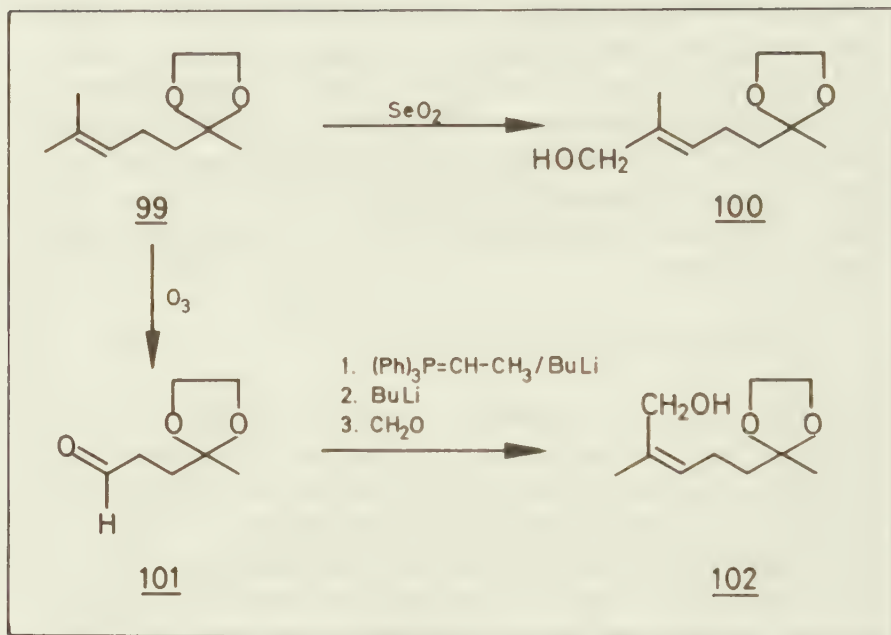


Schema 25

In neueren Arbeiten [111,116] wurde nicht mit SeO_2 allein, sondern unter Zusatz von 30proz. H_2O_2 -Lösung oxidiert, wobei SeO_2 meist in katalytischen Mengen eingesetzt wurde (etwa 0,05 Moläquivalente). H_2O_2 oxidiert dabei entstehende Se^{II} -Verbindungen oder Se^0 gleich wieder zu Se^{IV} auf. Bessere Resultate als mit H_2O_2 wurden mit t-Butylhydroperoxid erreicht [116]. In allen Fällen beträgt die Stereoselektivität zur Oxidation spezifisch der (E)-ständigen Methylgruppe mehr als 90%.

2. Stereoselektive Wittig-Reaktion

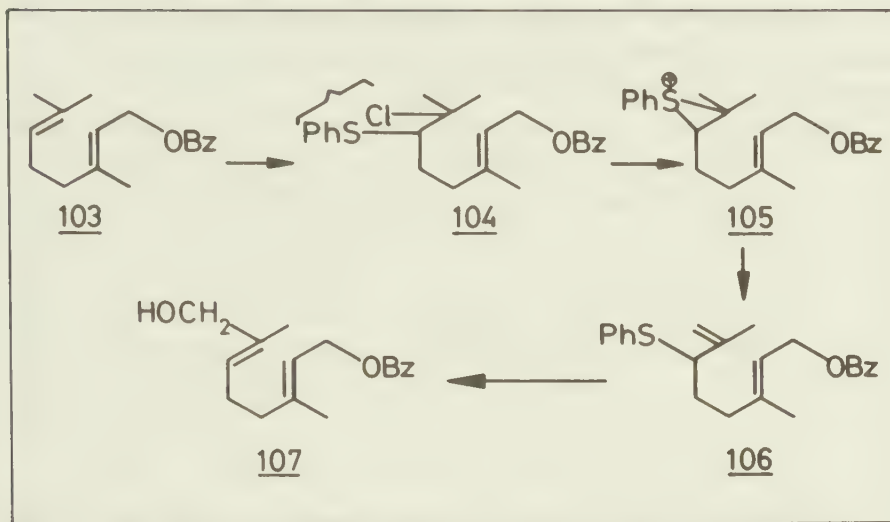
Taylor [117] konnte an 6-Methyl-5-hepten-2-on-äthylenketal (99) (Schema 26) selektiv entweder die (E)- oder die (Z)-ständige Methylgruppe funktionalisieren. Zur Funktionalisierung der (E)-ständigen Methylgruppe benutzte er ebenfalls die SeO_2 -Oxidation. Die Funktionalisierung der (Z)-ständigen Methylgruppe gelang über den Umweg der reduktiven Ozonolyse der Doppelbindung zum Aldehyd 101 und einer anschliessenden modifizierten Wittig-Reaktion nach Schlosser et al. [118], der sog. SCOOPY-Reaktion. Dabei wird zum Wittigsalz aus Äethylbromid erst 1 Äquivalent Butyllithium und der Aldehyd 101 gegeben, dann nochmals 1 Äquivalent Butyllithium und Formaldehyd. In 35-45proz. Ausbeute wurde der (Z)-isomere Allylalkohol 102 erhalten. Eine ähnliche Synthese führten Coates et al. [119] durch zur Darstellung von Geranylgeraniol.



Schema 26 Wahlweise Funktionalisierung der (E)- oder der (Z)-ständigen Methylgruppe

3. Funktionalisierung über den Phenylsulfenylchlorid-Komplex

Eine weitere Methode zur Funktionalisierung des Isopropyliden-Endstücks von Isoprenoiden geben Masaki et al. an, angewandt bei Geraniol [120] und bei Farnesol [121]. Im weiteren sei nur die Funktionalisierung an Geraniol besprochen (Schema 27). Phenylsulfenylchlorid bildet mit Geranylbenzyläther (103) die regioisomeren Addukte 104, welche bei Erwärmen auf 60°C in DMF zu 88% das methallylische Sulfid 106 geben, welches über das Episulfoniumkation 105 entsteht. Oxidation des Sulfids 106 zum Sulfoxid mit NaJO_4 und Behandeln desselben mit Trimethylphosphit nach der Methode von Evans et al. [122] liefert in 87% Ausbeute (E)-10-Hydroxygeranylbenzyläther 107. Die Gesamtausbeute ab 103 beträgt 76%.



Schema 27 Funktionalisierung über den Phenylsulfenylkomplex 104

4. Biologische Funktionalisierung der Isopropyliden-Endgruppe

Mit Kallus-Kulturen von Nicotiana tabacum Sorte "Bright Yellow" konnten Suga et al. [123] selektiv die (E)-ständige Methylgruppe der Isopropylidengruppe von Linalool und einigen Derivaten davon in einer Ausbeute von ca. 15% zur Hydroxymethylgruppe oxidieren. Akhila und Banthorpe [38] benutzten ein Oxidase-System aus Vinca rosea und konnten damit ebenfalls die (E)-ständige Methylgruppe zur Hydroxymethylgruppe oxidieren.

5. Andere Funktionalisierungsmöglichkeiten

Für weitere, zusammenfassende Arbeiten über Funktionalisierung der endständigen Isopropylidengruppe im weitesten Sinn, nicht nur der geminalen Methylgruppen, auf welche jedoch nicht im einzelnen darauf eingegangen werden soll, sei auf folgende Publikationen verwiesen: Photooxidation von Olefinen [124], SeO_2 -Oxidation [125], Terminale Epoxide von Steroiden und acyclischen Terpenen [126], Isomerisierung von Oxiranan zu Allylalkoholen mit Dialkylbortrifluor-methansulfonaten [127], Regioselektivität und Stereospezifität allyli-

scher Alkylierung über Allylpalladiumkomplexe und stereokontrollierte Synthese acyclischer Terpene [128], Wittig-Reaktion mit bevorzugter Bildung des (E)-Isomeren [129].

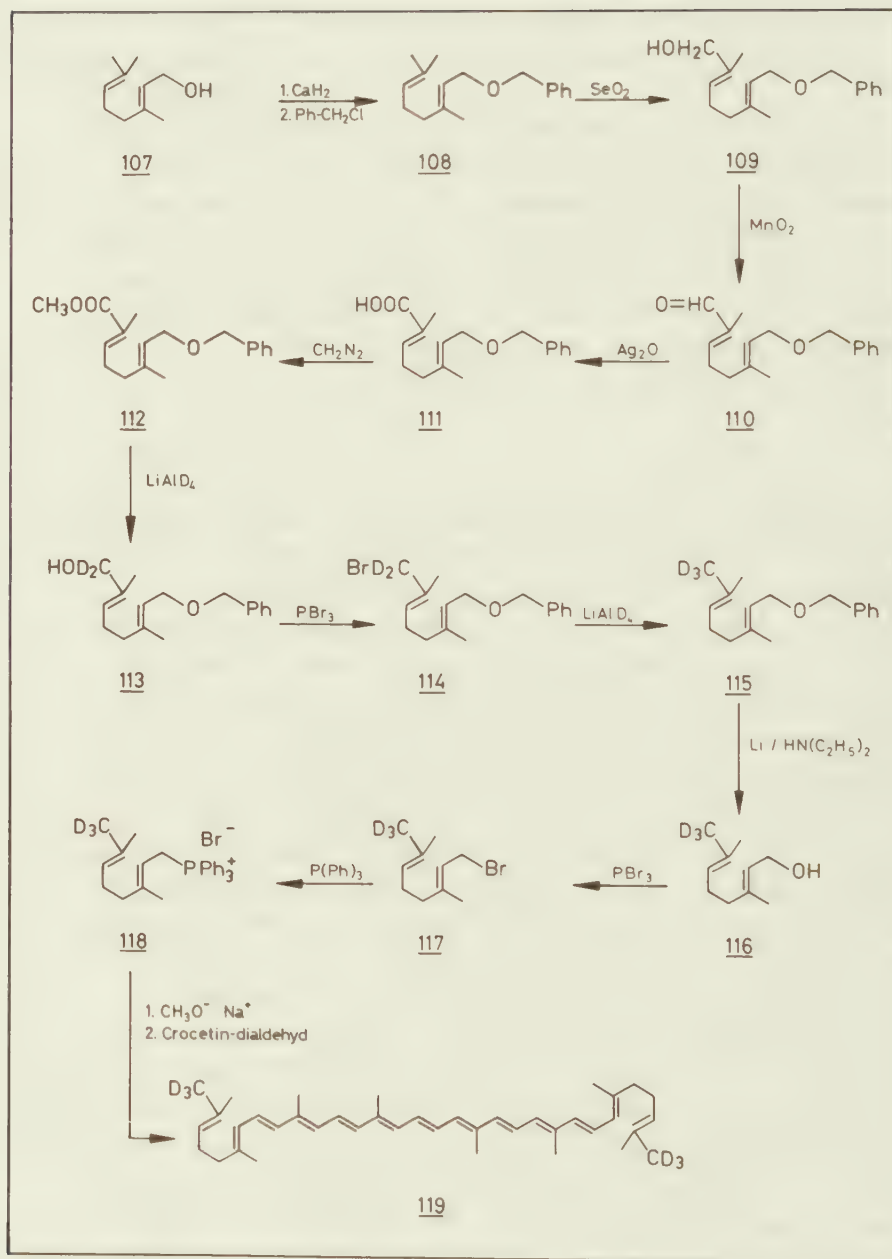
VII. Eigene Arbeiten 2. Teil

Synthese von $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin

Wie in Kap. III.2.4. erwähnt wurde, war das neue Ziel die Synthese des offenkettigen Carotins Lycopin, welches an je einer der endständigen, geminalen Methylgruppen mit Deuterium markiert war. Für diese Synthese bot sich zur Zeit der Ausführung die regio- und stereoselektive SeO_2 -Oxidation der (E)-ständigen Methylgruppe von Geraniol [109] an, welche auf diese Weise funktionalisiert wurde. Nach der Darstellung von $[(\text{E})-8,8,8-^2\text{H}_3]$ Geraniol wurde Lycopin nach dem Syntheschema $\text{C}_{10}+\text{C}_{20}+\text{C}_{10}$ aufgebaut.

1. Durchführung der Synthese, Uebersicht (siehe Schema 28)

Für die Oxidation und die Folgesynthese musste vorerst die Hydroxylgruppe von Geraniol (107) geschützt werden durch Bildung des Benzyläthers 108. Nach der Oxidation von 108 zum Alkohol 109 (und teilweise zum Aldehyd 110) wurde mit basischem MnO_2 vollständig weiteroxidiert zum Aldehyd 110 und mit Ag_2O in heisser NaOH [130] zur Säure 111. Weil die SeO_2 -Oxidation mehrere Nebenprodukte lieferte, welche zudem beim Stehenlassen immer wieder rotes Se^0 ausschieden, wurde auf die Darstellung reiner Substanzen auf Alkohol-, Aldehyd- und Säurestufe verzichtet. Auch die in [109] beschriebene Chromatographie von Alkohol 109 an Kieselgel mit Hexan/Essigester bewährte sich bei grösseren Ansätzen nicht. Stattdessen wurde lediglich eine Abtrennung des überschüssigen Benzyläthers 108 von allen polaren Produkten durch Chromatographie an Alox mit Methylenchlorid und Aethanol durchgeführt. Auf der Säurestufe erfolgte eine Abtrennung der unerwünschten Neutralteile durch Extrahieren der alkalischen Phase mit Aether. Diese Möglichkeit der partiellen Reinigung auf der Säurestufe war denn auch der Grund, warum für die Hauptmenge nicht die elegante Methode von Corey et al. [131] angewandt wurde, welche eine direkte Oxidation des Aldehyds 110 über dessen Cyanhydrin mit MnO_2 in Methanol zum Ester 112 ermöglicht hätte.



Schema 28

Die Darstellung des basischen MnO_2 erfolgte zunächst nach [132] mit einem Ueberschuss an KMnO_4 , welches aber nur sehr schwer und nur durch mehrmaliges Zentrifugieren (bis 20 mal) vollständig entfernt werden konnte. Durch Einsetzen nahezu stöchiometrischer Mengen von MnSO_4 und KMnO_4 wurde ein sehr aktives, alkalisch gefälliges MnO_2 erhalten, welches zudem relativ leicht von KMnO_4 zu reinigen war.

Mit Diazomethan, hergestellt nach [133], wurde der Methylester 112 dargestellt, welcher chromatographiert und destilliert werden konnte. Nun erfolgte stufenweise Reduktion des Esters mit LiAlD_4 zum deuterierten Alkohol 113 und über das Bromid 114 zum $[8,8,8\text{-}^2\text{H}_3]$ Geranylbenzyläther (115). Wie sich erst später herausstellte, war jedoch die Bromierung mit PBr_3 unter Zugabe von CaH_2 als Schutzbase nach Corey [134] nicht sehr günstig, da im Hauptansatz immerhin etwa 40% des Bromids nukleophil durch das an und für sich nicht besonders nukleophile Hydridion des CaH_2 substituiert wurde. Dadurch betrug der Deuterierungsgrad der Methylgruppe im Endprodukt ungefähr 2,6 anstatt 3,0.

Die Benzylätherspaltung wurde nach [109] in Diäthylamin mit Lithium bei -78°C durchgeführt; allerdings wurde nicht die Li-Lösung, sondern der Benzyläther vorgelegt und nur soviel Lithium zugegeben, als gerade verbraucht wurde.

Das erhaltene $[8,8,8\text{-}^2\text{H}_3]$ Geraniol wurde gemäss der Lycopin-Synthese nach Isler et al. [135] mit $\text{PBr}_3/\text{Pyridin}$ ins Bromid 117, dieses mit Triphenylphosphin ins Triphenylphosphoniumbromid 118 übergeführt und in einer doppelten Wittig-Reaktion mit Crocetin-dialdehyd verknüpft. Anstelle von Butyllithium wurde Natriummethanolat verwendet. Butylenoxid als Base [136] lieferte vorwiegend 8'-Apo-lycopinal.

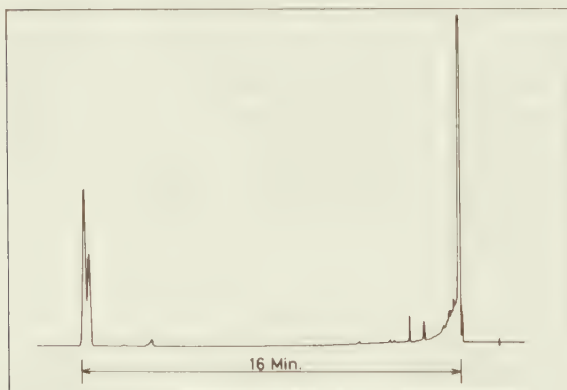
2. Identifizierung der deuterierten Verbindungen

2.1. Gaschromatographische Trennung von $[8,8,8-^1\text{H}_3]$ und $[8,8,8-^2\text{H}_3]$ Geranylbenzyläther

Auf einer GC.-Kolonne UCON HB 5100, Länge 40 m, Durchmesser 0,32 mm, war es möglich, undeuterten und deuterierten Geranylbenzyläther im Gemisch analytisch zu trennen. Bei einer Kolonnen-temperatur von 185°C (Block 280°C) und einem Druck von 0,8 atm wies der undeuterte Geranylbenzyläther eine Retentionszeit von 15'42" auf, die deuterierte Verbindung eine solche von 15'54" ab Lösungsmittelpeak. Die Verdünnung betrug 1,0 μl undeuterten und 2,5 μl deuterierten Geranylbenzyläther in 2,5 ml Pentan (s. Figur 1).

Eine analoge signifikante und reproduzierbare, wenn auch nicht so deutliche Aufspaltung wurde auch mit einer GC.-Kolonne SE-52, Länge 20 m, Durchmesser 0,25 mm erreicht. Die Kolonnentemperatur betrug 120°C (Block 180°C), der Druck 0,8 atm. Bei einer Retentionszeit von ca. 38 Minuten ergab sich eine Zeitdifferenz von 10-15 Sekunden, wobei der Peak der undeuterten Verbindung bei einem Mischungsverhältnis von $^1\text{H}_3/^2\text{H}_3 = 1:3,6$ als Schulter auf dem Peak der undeuterten Verbindung erschien.

Fig. 1: Gaschromatogramm eines Gemisches von undeutertem (108) und deuteriertem (115) Geranylbenzyläther.

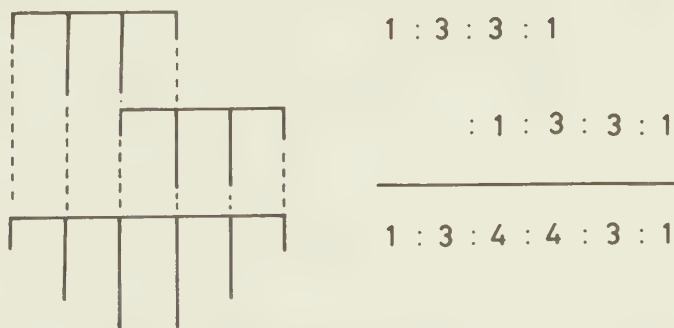


2.2. NMR.-spektroskopische Beweise

Sowohl beim Ester 112 wie auch beim $[8,8,8-^2\text{H}_3]$ Geranylbenzyl-äther (115) wurde NMR.-spektroskopisch gezeigt, dass die Ester-funktion resp. die Deuteromethylgruppe wie erwartet (E)-ständig zur Kette ist.

2.2.1. Beweis auf der Ester-Stufe

Beim Ester 112 wurde das Signal der Ester-carbonylgruppe im ^{13}C -NMR.-Spektrum betrachtet. Im unentkoppelten Spektrum ist eine Aufspaltung dieses Signals in 32 Linien zu erwarten, nämlich ein Quartett durch ^3J -Kopplung mit OCH_3 , ein weiteres Quartett durch ^3J -Kopplung mit der geminalen Methylgruppe, und ein Dublett durch ^3J -Kopplung mit dem Methin-Proton an C(6). Durch selektive Entkopplung mittels Einstrahlen bei 171,5 Hz (Mitte Methylregion im ^1H -NMR.-Spektrum) verschwindet die ^3J -Kopplung zur Methylgruppe, so dass noch 8 Linien zu erwarten sind. Gefunden wurden 6 Linien im Intensitätsverhältnis 1:3:4:4:3:1. Diese Linien kommen durch Ueberlagerung von 2 Quartetten mit Intensitätsverhältnissen von je 1:3:3:1 zustande (Schema 29).



Schema 29

Aus dem Linienabstand a wird eine reduzierte Kopplung $^3J_{\text{red.}}$ zur OCH_3 -Gruppe von 2,96 Hz, aus dem Abstand b eine $^3J_{\text{red.}}$ -Kopplung von 6,08 Hz zum Methin-Proton gemessen. Rückrechnung auf 3J_0 ergibt Kopplungskonstanten von 3,7 Hz zur OCH_3 -Gruppe und 6,3 Hz zum Methin-Proton. Nach [137] ist eine Kopplungskonstante von 6,5-7,6 Hz typisch für eine (Z)-, eine solche von 12,8-14,5 Hz typisch für eine (E)-Relation zwischen dem Carbonyl- ^{13}C -Atom und dem Methin-Proton.

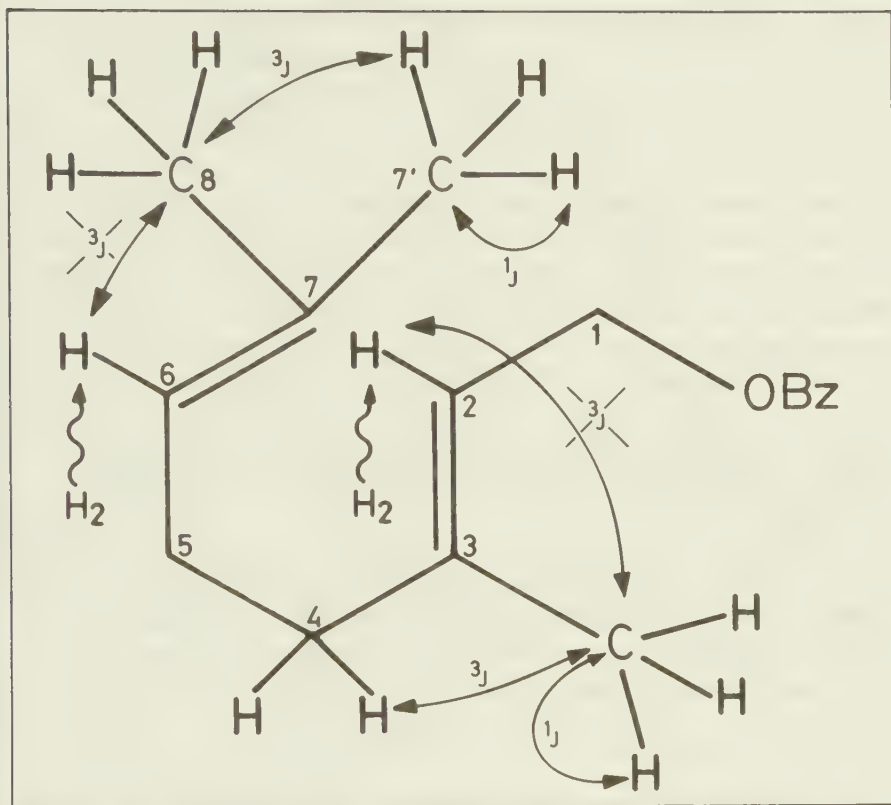
Damit ist bewiesen, dass die Esterfunktion (E)-ständig zur Kette ist, d. h. das Methin-Proton an C(6) (Z) zur Estergruppe.

2.2.2. Beweis auf der Geranyl-benzyläther-Stufe

Eine ähnliche Beweisführung wurde auf der Stufe des deuterierten Geranylbenzyläthers durchgeführt. Ausser 100 MHz-Protonenspektren von deuteriertem und undeuteriertem Geranylbenzyläther wurden jeweils von beiden Rausch- sowie selektiv entkoppelte ^{13}C -NMR.-Spektren aufgenommen, letztere durch Einstrahlen bei 5,23 ppm (Methinprotonen-Region im ^1H -NMR.-Spektrum). Aufgrund der Aufspaltungsmuster und der Grösse der reduzierten Kopplungen wurden zunächst alle ^{13}C -Signale zugeordnet. Insbesondere mussten im ^{13}C -Spektrum des undeuterierten Geranylbenzyläthers die drei Methylgruppen $\text{H}_3\text{C-C}(3)$, $\text{H}_3\text{C-C}(7)$ ((Z)-ständig) und $\text{H}_3\text{C}(8)$ ((E)-ständig) erkannt werden. Dies geschah einerseits durch Betrachten von Kopplungen, andererseits durch Shift-Ueberlegungen. In Schema 30 sind die Kopplungsverhältnisse im undeuterierten Geranylbenzyläther dargestellt.

Vorauszuschicken ist, dass ^4J -Longe-range-Kopplungen nicht mehr erkannt werden können und für die folgende Betrachtung nicht mit einbezogen werden müssen.

Die Methylgruppe an C(3) müsste im unentkoppelten ^{13}C -Spektrum als Quartett ($^1J_{\text{C-H}}$) mal Triplett ($^3J_{\text{C-CH}_2}$) mal Dublett ($^3J_{\text{C-CH}}$) er-



Schema 30 Kopplungen im ^{13}C -Spektrum von Geranylbenzyläther (108)

scheinen. Durch die selektive Entkopplung (Einstrahlen bei 5,23 ppm) fällt aber $^3J_{C-CH}$ weg, und das Signal erscheint als Quartett mal Dublett. Somit kann dieses Signal auf diese Weise von denjenigen der beiden geminalen Methylgruppen unterschieden und zugeordnet werden.

Die beiden geminalen Methylgruppen weisen je $^3J_{C-CH_3}$ -Kopplungen zueinander sowie $^1J_{C-CH}$ -Kopplungen innerhalb der Methylgruppen auf. Die $^3J_{C-CH}$ -Kopplungen zum Methin-Proton an C(6) verschwinden ebenfalls wegen der selektiven Entkopplung. Für die beiden Methylgruppen bleibt somit nur noch die Aufspaltung Quartett mal Quartett übrig. Mit Betrachtungen von Kopplungskonstanten können diese beiden Methylgruppen nicht unterschieden werden.

Eine Unterscheidung ist jedoch möglich, wenn man Shift-Argumente betrachtet. Der Sog. "γ-Effekt" bewirkt, dass die (Z)-ständige Methylgruppe mehr beschirmt wird als die (E)-ständige und somit bei höherem Feld (tieferen ppm-Werten) erscheint [137].

Aufgrund dieser Zurodnungen bei der undeutierten Verbindung konnte ohne Schwierigkeiten im ^{13}C -Spektrum der deutierten Verbindung die CD_3 -Gruppe erkannt werden. In einer gespreizten Aufnahme der Methylregion konnten nun die C-D- sowie die C-H-Kopplungen herausgelesen werden. Wie erwartet betrug die C-D- ^1J -Kopplung (18,8 Hz) rund den 6,55ten Teil der C-H- ^1J -Kopplung (123,1 Hz).

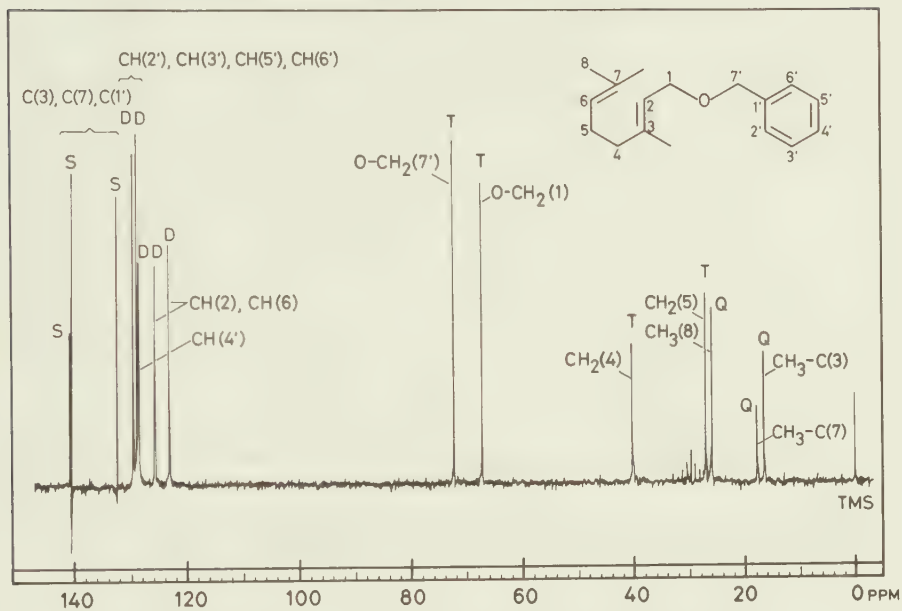
Mit diesen Daten ist somit auch auf der Stufe des deutierten Geranylbenzyläthers bewiesen, dass die CD_3 -Gruppe (E)-ständig zur Kette steht.

In den Figuren 2 und 3 sind die rauschentkoppelten ^{13}C -NMR.-Spektren des undeutierten und des deutierten Geranylbenzyläthers abgebildet, in den Figuren 4 und 5 die ^1H -NMR.-Spektren des undeutierten und des deutierten Geraniols.

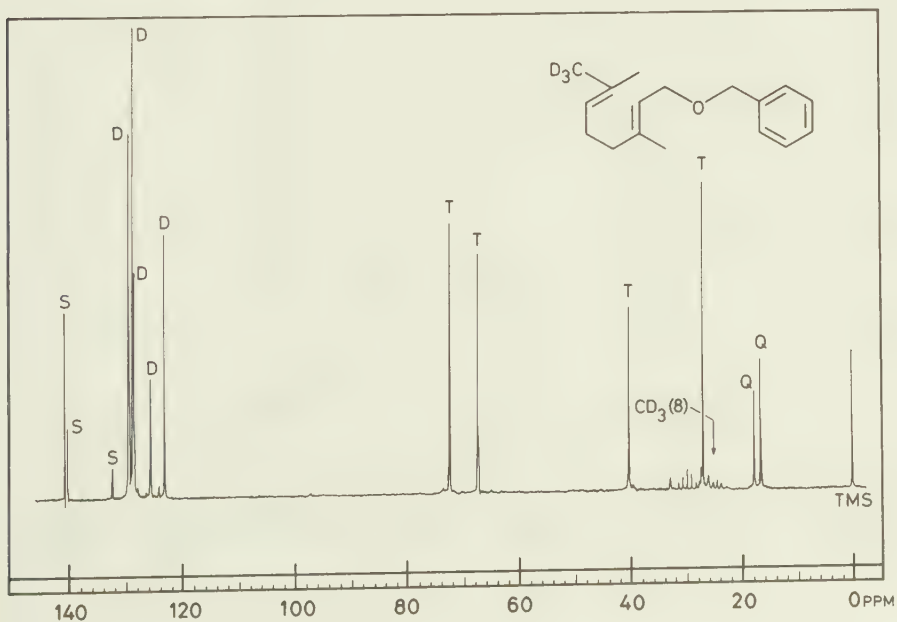
2.3. NMR.-Spektren von undeutiertem und $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin (siehe Figuren 6 und 7)

Aufgrund des Fehlens des CD_3 -Signals im ^1H -NMR.-Spektrum von $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin (119) ist auch eine eindeutige Zuordnung der geminalen Methylgruppen in Lycopin möglich. Die (Z)-ständige Methylgruppe erscheint bei 1,65 ppm, die (E)-ständige feldtiefer bei 1,72 ppm.

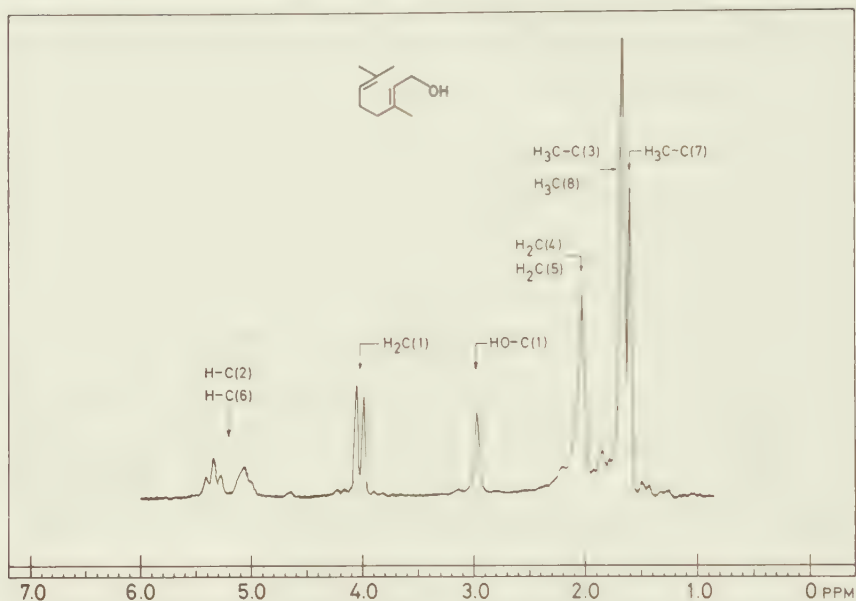
Figur 2: Rauschentkoppeltes ^{13}C -Spektrum von undeuteriertem Geranylbenzyläther (108)



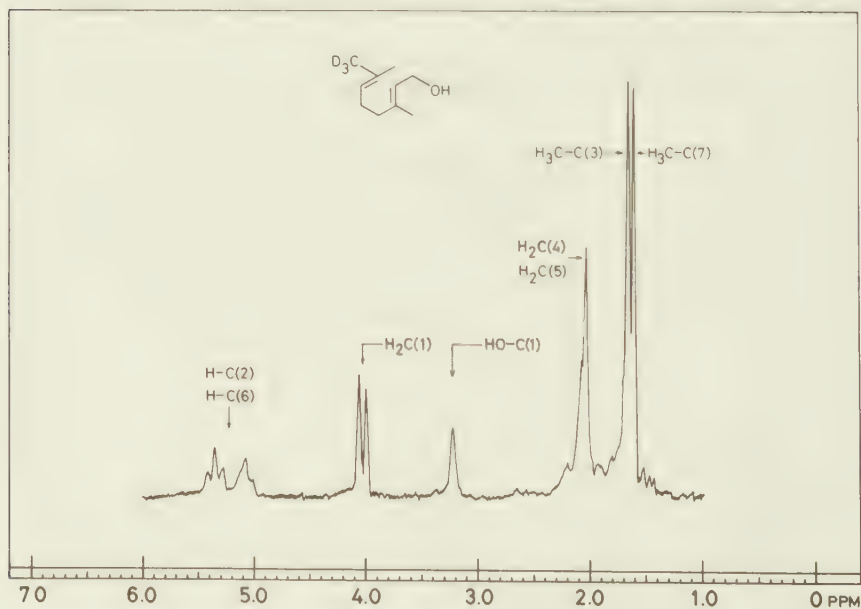
Figur 3: Rauschentkoppeltes ^{13}C -Spektrum von deuteriertem Geranylbenzyläther (115)



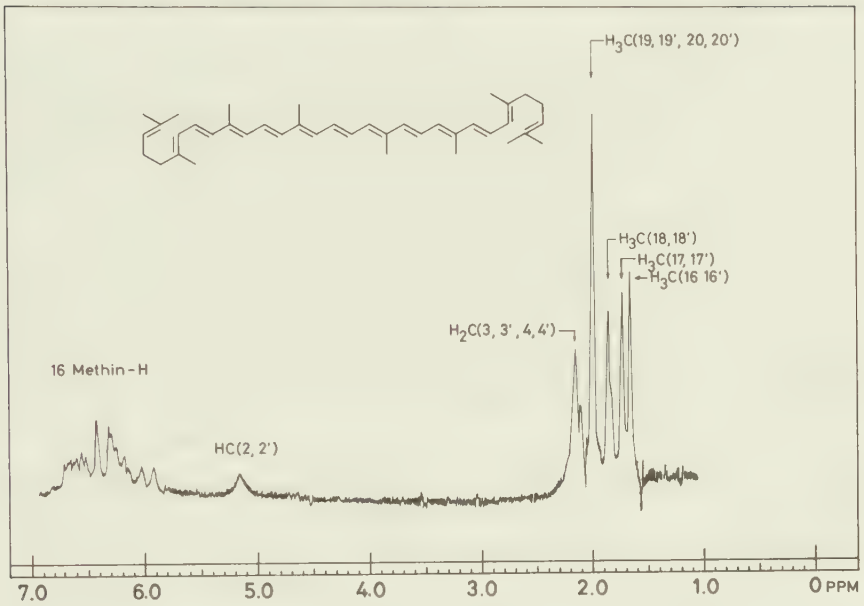
Figur 4: ^1H -NMR.-Spektrum von undeutertem Geraniol (107)



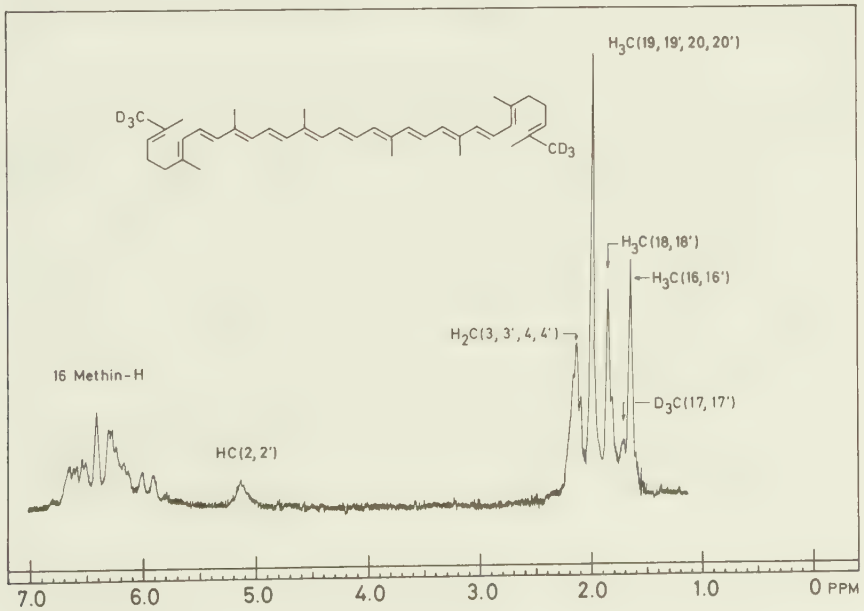
Figur 5: ^1H -NMR.-Spektrum von deuteriertem Geraniol (116)



Figur 6: ^1H -NMR.-Spektrum von undeutertem Lycopin



Figur 7: ^1H -NMR.-Spektrum von $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin (119)



2.4. Massenspektren von undeutertem und $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin

Die Massenspektren des deuterierten und des undeuterten Lycopins zeigen die erwarteten Unterschiede in den Massenzahlen. Als Molekularpeak wird $m/z = 542$ resp. 536 erhalten. Der Peak $m/z = 470$ ($M^+ - 72$) resp. 467 ($M^+ - 69$) entspricht der Fragmentierung zwischen den C-Atomen 3 und 4; d.h. es wird $\text{CD}_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2$ resp. das entsprechende undeuterte Fragment abgespalten. Dieselbe Fragmentierung, ev. über mehrere Zwischenstufen, muss auch dem Peak $m/z = 72$ resp. 69 zugeschrieben werden, allerdings mit der Ladung auf diesem Fragment. Weiter werden die Peaks $m/z = 450$ (444) und $m/z = 436$ (430) beobachtet, welche der Abspaltung von Toluol und Xylol entsprechen. Die Peaks $m/z = 119$, 105 und 91 kommen sowohl im Spektrum des deuterierten als auch des undeuterten Lycopins vor und werden den Fragmenten $(\text{C}_7\text{H}_5)(\text{CH}_3)_2^+$, $(\text{C}_7\text{H}_6)(\text{CH}_3)^+$ und $(\text{C}_7\text{H}_7)^+$ zugeordnet [104].

VIII . Erwartungen, Ausblick

Die Synthese von $[17,17,17,17',17',17'-^2\text{H}_6]$ Lycopin ist ein erster Schritt in unserer Arbeitsgruppe in der Aufklärung der Stereochemie der Ringschlussreaktionen für später vorgesehene enzymatische in vitro-Cyclisierungen. Für den Fall der Bildung von β,β -Carotin werden damit Rückschlüsse auf die Chiralität am C-Atom 1 möglich sein, für β,ϵ - oder ϵ,ϵ -Carotin auch für das C-Atom 6. Weitere isotopenmarkierte Lycopin- oder Neurosporinmoleküle werden aber notwendig sein, um die Stereochemie des Ringschlusses aufzuklären; so z. B. müsste Deuterium auch ins Zentrum 2 eingebaut werden sowie Vorläufer mit (5,6Z)-Doppelbindung eingesetzt werden [56, 138].

Es ist wahrscheinlich, dass mit isolierten Enzymen Carotine im allgemeinen gleichzeitig sowohl mit β - als auch mit ϵ -Ringen erhalten werden können; für den β -Ring ist die Markierung analog dem Resultat von Bu'Lock et al. [53, 54] mit ziemlicher Sicherheit in der pro(R)-Methylgruppe an C(1) zu erwarten. Beim ϵ -Ring kann vorausgesetzt werden, dass an C(6) wie in allen Pflanzen (R)-Chiralität gefunden wird. Für die Stellung der CD_3 -Gruppe an C(1) sind folgende zwei Fälle zu unterscheiden:

Fall A: Markierung in der pro(R)-Methylgruppe an C(1):

Aufgrund der Herleitung in Kapitel II und dem Postulat, dass Sessel gegenüber Wannen bevorzugt sein sollen, wäre das Erscheinen der Markierung in der pro(R)-Methylgruppe "verboten", ausser man könnte eindeutig nachweisen, dass ein Isomerase-Enzym das darbotene deuterierte (5E)-Lycopin vorerst zu (5Z)-Lycopin isomerisiert hat. Es dürfte also nur β,β -Carotin gefunden werden, welches über $\text{S}_1(5,6\text{E})$ oder $\text{S}_1(5,6\text{Z})$ gebildet worden ist. Das Fehlen von Carotinen mit ϵ -Ringen der genannten (R)-Chiralität an C(1) wäre ein indirekter Beweis für die These [56], dass aus Vorläufern mit (5E)-Doppelbindungen bevorzugt β -Ringe, aus solchem mit (5Z)-Doppelbindungen nur ϵ -oder γ -Ringe gebildet werden.

Selbstverständlich müsste in einem Parallelversuch bewiesen werden, dass das Enzymgemisch auch tatsächlich fähig ist, aus (5Z)-Lycopin überhaupt Carotine mit ϵ -Ringen zu bilden.

Würden trotzdem aus Cyclisationsversuchen mit (5E)-Lycopin, wie es in der vorliegenden Arbeit synthetisiert wurde, Carotine mit ϵ -Ringen und Markierung in der pro(R)-Methylgruppe an C(1) gefunden, so wäre eine oder mehrere der gemachten Voraussetzungen falsch; z. B. wären Wannenfaltungen oder aber der Cyclisation vorausgehende Isomerisierungen nicht auszuschliessen. Allerdings wurden bis heute noch nie offenkettige Carotine mit (5Z)-Doppelbindungen gefunden resp. beschrieben. Für künftige Abklärungen sollen sie nun aber synthetisch hergestellt werden [138].

Fall B: Markierung in der pro(S)-Methylgruppe an C(1):

Unter den gemachten Voraussetzungen würde dieser Fall auftreten, wenn der (6R)- ϵ -Ring über C₂(5,6E) entstanden ist. Falls das gleichzeitig gebildete β,β -Carotin die Markierung wie nach Bu'Lock et al. [53, 54] in der pro(R)-Methylgruppe enthält, wäre dies ein Hinweis dafür, dass ϵ - und β -Ringe über enantiomere Sessel (resp. Wannen) entstehen würden, ohne dass eine Isomerisation an der 5,6-Doppelbindung vorausgehen müsste.

Die Fragestellung um die genaue Kenntnis der Stereochemie der Ringschlussreaktion ist also noch sehr komplex, weil einerseits noch viel zu wenig Daten vorhanden sind und andererseits erst die künftigen Versuche zeigen werden, welche Voraussetzungen und Bedingungen als wesentliche Parameter eine Rolle spielen. Nicht zuletzt hängt die Lösung des Problems auch davon ab, ob in der Zukunft ein Enzymsystem gefunden werden kann, welches die verschiedenen markierten und konfigurierten offenkettigen Vorläufer in befriedigendem Mass zu cyclisieren vermag.

IX. Verdankungen

Allen, welche zum guten Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken, insbesondere

Herrn H. Frohofer und Mitarbeiterinnen für die zahlreichen Mikroanalysen, Isotopenbestimmungen und IR.-Spektren,

Herrn Dr. U. Vögeli aus der Abteilung von Herrn Prof. W. von Philipsborn für die grosse Hilfe beim Messen und Interpretieren der ^{13}C -NMR.-Spektren,

Herrn Prof. Dr. M. Hesse und seinem Team für die Aufnahme von Massenspektren,

Der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. für die Ueberlassung von 10 g synthetisch hergestelltem (all E)-Crocetindialdehyd,

Herrn Dr. R. Stadelmann vom Institut für spezielle Botanik der ETH für die Zurverfügungstellung der Algen sowie für die wertvolle Unterstützung bei der Kultivierung derselben,

Allen Kolleginnen und Kollegen unserer Carotingruppe für wertvolle Diskussionen, Dr. R. Buchecker, P.A. Bütikofer, Dr. H. Cadosch, Dr. W. Eschenmoser, A. Haag, E. Märki, Dr. H.P. Märki, H. Meier, U. Marti, N. Vergos, G. Werner und A. Zumbrunn.

Herrn Dr. H.P. Märki für die Ueberlassung der Reinzeichnungen über die Faltungsmechanismen,

Frau H. Bild für die sorgfältige Reinschrift dieser Arbeit.

X. Experimenteller Teil

1. Allgemeines

1.1. Apparatives

Die Spektren wurden an folgenden Apparaten gemessen:

UV./VIS.: Beckman Acta III, Perkin-Elmer 552

Beschreibung: UV./VIS. (Lösungsmittel): $\lambda_{\max}$ in nm [e]
Sch. = Schulter

IR.: Perkin-Elmer-Spectrograph, Modell 257, mit NaCl-Optik.
Beschreibung: IR. (Lösungsmittel): Wellenzahl in cm^{-1} ,
s = stark, m = mittel, w = schwach.

MS.: CEC 21-110 B und Varian MAT 711, bei 70 eV, Direkt-
einlass.
Beschreibung: Masse des Ions in Einheiten m/z (rel. In-
tensität in %). Es werden nur die intensivsten Peaks so-
wie jene mit plausibler Interpretation aufgeführt.

^1H -NMR.: Varian HA-100 MHz und Varian T-60 MHz.

Beschreibung: NMR. (Lösungsmittel): δ -Werte in ppm
rel. zu internem TMS (= 0 ppm), Multiplizität: s = Sin-
gulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett mit δ -
Bereichsangabe, Kopplungskonstanten J in Hertz, aus dem
Integral abgelesene Protonenzahl, Zuordnung.

^{13}C -NMR.: Varian XL-100; Frequenz 25,2 MHz.

Beschreibung: ^{13}C -NMR. (Lösungsmittel): δ -Werte in
ppm (TMS = 0 ppm), Multiplizität (falls aus "off-
resonance"-Spektren bekannt), Kopplungskonstanten in
Hertz, falls aus unentkoppelten Spektren bekannt.

Radioaktivitätsmessungen: Packard Int. Liquid Scint. Counter 3320.
Angabe in dpm.

GC.: Carlo Erba Fractovap, Modell G I, Typ AID mit Flammenionisationsdetektor und H_2 als Trägergas. Kolonne: Jeweils im Text angegeben.

Ozonisationen: Welsbach Ozonisator Modell T-23

1.2. Chromatographie

Analytische DC.:

Aluminiumoxid Polygram Alox N/UV₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm (Macherey-Nagel & Co.).

Erkennungsmethoden: Betrachten des DC. unter UV.-Lampe und/oder Sichtbarmachen durch Besprühen mit 1proz. alkalischer $KMnO_4$ -Lösung.

Säulenchromatographie:

Adsorptionsmittel: Aluminiumoxid (Fluka Typ 507 C, neutral, Aktivität I, nach Brockmann).

Aluminiumoxid (Woelm Pharma GmbH. & Co., neutral, durch Wasserzusatz auf Aktivität IV gebracht).

Kieselgel 60 (Merck 7734, Korngrösse 0,063-0,200 mm).

Magnesiumoxid (Fisher Sci. Co. (N.J.)), Adsorptive Magnesia S-120.

Magnesiumhydroxidcarbonat (Merck 5827).

1.3. Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden im offenen Röhrchen (Ausnahme Carotine) auf einem Schmelzpunktbestimmungsapparat nach Dr. Totoli gemessen. Wo angegeben, sind die Werte korrigiert.

1.4. Reinheit der Chemikalien und Produkte

Ausgangsmaterialien und Lösungsmittel wurden zur Hauptsache von

den Firmen Fluka, Merck und Siegfried bezogen und besaßen die Reinheit puriss. oder purum. Sie wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Für feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden die Lösungsmittel speziell getrocknet.

Die radioaktiven Präparate wurden von den Firmen "cis" (CEA IRON SORIN) und "NEN" (New England Nuclear) bezogen.

Die Reinheit der im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Produkte wurde spektroskopisch sowie durch Verbrennungsanalyse bestimmt.

1.5. Abkürzungen

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen und allgemein gebräuchlichen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

HV. = Hochvakuum

RT. = Raumtemperatur

proz. = prozentig, bezogen auf Gehalt einer Komponente im Teilvolumen

% = Prozent, bezogen auf Gehalt im Totalvolumen

ges. = gesättigt

konz. = konzentriert

Smp. = Schmelzpunkt

Kp. = Siedepunkt (tiefgestellter Index gibt Druck in Torr an)

Upm. = Umdrehungen pro Minute

1.6. Verbrennungsanalyse deuterierter Verbindungen

Deuterierte Verbindungen ergeben bei der Verbrennungsanalyse CO_2 und ein Gemisch aus H_2O und D_2O . Die angegebenen, gemessenen Prozentwerte für (H+D) wurden gemessen, wie wenn kein Deuterium vorhanden gewesen wäre; dafür wurden die berechneten Werte um den Anteil des Deuteriums korrigiert.

2. Synthese von $[3',3',3'-^2\text{H}_3]$ 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure (32)

2.1. $[2,2,2-^2\text{H}_3]$ Essigsäuremethylester (32)

11,2 g (10,0 ml, 0,175 Mol) Tetradeuteroessigsäure (31) wurden mit einem Ueberschuss einer relativ konzentrierten, über KOH vorge-trockneten ätherischen Lösung von Diazomethan versetzt. Der in Aether gelöste Ester wurde über MgSO_4 getrocknet. Eindampfen des Aethers ohne Verlust an Produkt war nicht möglich, selbst nicht über eine Raschig-Kolonne von 1 m Länge.

2.2. $[4',4',4'-^2\text{H}_3]$ 4-Hydroxy-4-methyl-1,6-heptadien (33)

Ungefähr 13,25 g (0,175 Mol, geschätzte Menge aus Veresterung) 32 in etwa 0,5 l Aether wurden zu einer Lösung aus 51,0 g (0,422 Mol) Allylbromid und 25,2 g (1,036 Mol) Magnesium in 200 ml Aether zu-getropft, nachdem die Grignard-Lösung 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt worden war. Nach der Zugabe von 32 wurde während 4 Stun-den weiter unter Rückfluss erhitzt und der Ansatz über Nacht stehen gelassen. Nach Zugabe von Eis und ges. NH_4Cl -Lösung wurde unge-löstes Magnesium abfiltriert und die wässrige Lösung mehrmals mit Aether extrahiert. Die vereinigten Aetherextrakte wurden je einmal mit ges. NaHSO_3 -Lösung, ges. NaHCO_3 -Lösung und wenig Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und eingengt. Kurzwegdestilla-tion (Elnor-Glasapparatur) am Vakuum (Kp_{15} : 55-57°C) ergab 10,5 g (0,081 Mol) 33 in 46,5% Ausbeute bezüglich 31.

NMR. (CDCl_3): 1,07 (s, 3H, CH_3) nur bei undeutrierter Verb.;
2,17 (d, $J=8$ Hz, 4H, $2\times\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}$); 2,83 (s, 1H,
OH); 4,77-6,22 (m, 6H, $2\times\text{CH}=\text{CH}_2$).

IR. (Film): 785m, 890w, 915s, 945w, 960w, 1000s, 1050m, 1085m,
1130w, 1160w, 1230w, 1265w, 1290w, 1310w, 1378s,
1420w, 1440m, 1458w, 1645s, 1840w, 2930s, 2980s,
3080s, 3420ss.

2.3. [3',3',3'-²H₃] 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure (34)

Vorversuch mit undeutertem 33:

6,0 g (0,048 Mol) 4-Hydroxy-4-methyl-1,6-heptadien wurden in 80 ml Essigsäureäthylester und 20 ml Eisessig gelöst und bei -40°C bis zur Sättigung auf einem Welsbach-Ozonisator während ca. 5 Stunden bei 150 Volt und Flow 40 ozonisiert. Das Ozonid wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der sirupöse Rückstand je 3 mal mit 60 ml Eisessig versetzt und wieder eingeengt. Dann wurden nochmals 60 ml Eisessig zugegeben und 60 ml H₂O₂ (30proz.) in 60 ml H₂O und 5 Tropfen konz. H₂SO₄ zugetropft. Während 6 Stunden wurde unter Rückfluss erhitzt und der Ansatz über Nacht stehen gelassen.

Zur Neutralisation der H₂SO₄ neben der Dicarbonsäure 34a wurde beim einen Ansatz BaCO₃ im Ueberschuss zugegeben, mit heissem H₂O das Bariumsalz der Dicarbonsäure vom unlöslichen BaSO₄ extrahiert und zentrifugiert. Durch eine Ionenaustauschssäule mit Harz Amberlite CG 50 wurde die Dicarbonsäure freigesetzt. Ueberschüssiges H₂O₂ wurde durch Erwärmen über Platin auf Kohle zerstört (Prüfung mit KJ-Stärkepapier). Der eingeengte Rückstand wurde in Aceton gelöst, filtriert, eingeengt und die Säure aus Aether Petroläther (30-60°) umkristallisiert; Smp. 108-109°C. Ausbeute 4,5 g (0,028 Mol, 58%).

Beim anderen Ansatz wurde nur die zur Neutralisation der H₂SO₄ notwendige äquivalente Menge BaCO₃ (ca. 800-1000 mg) zugesetzt. Dadurch entfiel das Freisetzen der Dicarbonsäure an der Ionenaustauschersäule. Ausbeute 5,4 g (0,038 Mol, 69,5%).

NMR. (d₆-Aceton): 1,40 (s, 3H, CH₃); 2,72 (s, 4H, 2x-CH₂-); 8,1 (s breit, 3H, 2x-COOH und 1xC-OH).

IR. (KBr): 705s, 720m, 828m, 898w, 900s, 912s, 935s, 970w, 995m, 1092s, 1100s, 1115m, 1155s, 1210s, 1245m, 1285s, 1315m, 1350m, 1380s, 1410w, 1430 s, 1458w, 1710ss, 2500-3600s, breit.

MS.: 147(3,6, M^+-CH_3); 129(10, M^+-H_2O); 111(5, M^+-2H_2O); 103(26, $M^+-HOOC-CH_2$); 85(28, $103-H_2O$, $CH_3-CH=CH-COOH^+$); 43(100, CH_3CO^+).

$C_6H_{10}O_5$	Ber.	C	44,44	H	6,21%
(162,146)	Gef.	C	44,45	H	6,14%

Hauptversuch mit deuteriertem 33:

Die trideuterierte Verbindung wurde analog der undeuterierten hergestellt, wobei $BaCO_3$ äquimolar zu H_2SO_4 zugesetzt wurde. Aus Ansätzen zu 10,4 g (0,0806 Mol) 33 wurden Ausbeuten von 10,5 g (0,0636 Mol, 79%) erhalten. Smp. 106,0-106,5°C.

NMR. (d_6 -Aceton): 2,68 (s, 4H, $2x-CH_2-$); 7,5 (s, breit, 3H, $2x-COOH$, $1xC-OH$).

IR. (KBr): 700s, 775s, 792w, 835m, 887m, 880s, 1050s, 1065/1070m, 1125m, 1152m, 1205s, 1242m, 1282s, 1315m, 1350m, 1410w, 1428s, 1710ss, 2500-3600 s breit.

MS.: 147(4,5, M^+-CD_3); 129(11, M^+-H_2O); 111(5, M^+-2H_2O); 106(28, $M^+-HOOC-CH_2$); 88(33, $106-H_2O$, $CD_3-CH=CH-COOH^+$); 46(100, CD_3CO^+).

$C_6H_7D_3O_5$	Ber.	C	43,63	H+D	6,31%
(165,17)	Gef.	C	43,47	H+D	6,59%

3. Inkorporationsversuche in Algen

3.1. Apparatives

Chlorella vulgaris, Stamm 211-11h aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen wurden durch das Institut für spezielle Botanik zur Verfügung gestellt. Die von uns verwendeten Fermentoren der Marke Brunswick, Modell F-14, wurden vor dem Animpfen während 20 Minuten inkl. der Nährlösung bei 120°C autoklaviert. Die Zusammensetzung der Nährlösung pro Liter war die folgende:

1,05 g Harnstoff, 0,47 g NaCl, 0,47 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 ml einer 1 Liter-Spurenelementlösung (bestehend aus: 14 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g H_3BO_3 , 0,2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), 1 ml einer Fe-EDTA-Komplex-Lösung (bestehend aus: 26,1 g EDTA(III) in 268 ml 1N KOH, 24,9 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, H_2O ad 1000). Pro Fermentor wurden 10 Liter Nährlösung eingefüllt.

Zur Beleuchtung der Algenkultur wurden Fluoreszenzröhren der Marke Philips "Tageslicht FL 15 W/55" gewählt; nach dem Animpfen wurde mit 2 Lampen, ab drittem Tag mit 4 und ab 4. Tag mit 5 Lampen beleuchtet. Der mechanische Rührer drehte mit 280 Upm. Die Temperatur wurde auf 27⁺0,5°C einreguliert. Probeentnahme oder Substanzzugabe erfolgten steril durch Abfackeln mit einer Gasflamme. Die Frischluft wurde durch eng gestopfte Glaswatte und ein Glasrohr von 1 m Länge ($\emptyset = 4$ cm) mit granulierter Aktivkohle in einer Menge von 5-7,5 Liter/Minute in die Kultur eingeblasen.

3.2. Zubereitung der radioaktiven Reagenzien

[3-¹⁴C] HMG, totale Aktivität 50 μC , spezifische Aktivität 22,8 mC/mMol (entsprechend 356 μg oder 2,2 μMol HMG) resp. [4-¹⁴C] Valin, totale Aktivität 50 μC , spezifische Aktivität 39 mC/mMol (ent-

sprechend 150 μg oder 1,28 μMol wurden je quantitativ in ein 100 ml-Messkölbchen umgespült und nach Messen der Primäraktivität zu den Algenkulturen gegeben.

3.3. Wachstum und Inkorporation

Täglich zur gleichen Zeit wurde mittels einer Thoma-Zelle unter dem Mikroskop die Populationsdichte der Algen bestimmt sowie an den Tagen nach der Zugabe des radioaktiven Substrats je die Radioaktivität der "grünen" Lösung (Nährlösung plus Algen) (I_1) sowie der klaren, zentrifugierten Nährlösung allein (I_2). Der Quotient in % wurde aus der Division der beiden Zahlen, multipliziert mit dem Faktor 100, erhalten.

3.3.1. Algenkultur 1 ($[3\text{-}^{14}\text{C}]$ HMG)

Zugegebene Radioaktivität: 101'985 dpm / 0,05 ml, d.h. totale Aktivität $2,0397 \times 10^8$ dpm / 100 ml. Wachstum und Inkorporation: siehe Tabelle 1.

3.3.2. Algenkultur 2 ($[4\text{-}^{14}\text{C}]$ Valin)

Zugegebene Radioaktivität: 60'800 dpm / 0,05 ml, d.h. totale Aktivität $1,216 \times 10^8$ dpm / 100 ml. Wachstum und Inkorporation: siehe Tabelle 2.

3.3.3. Algenkultur 3 ($[3\text{-}^{14}\text{C}]$ HMG + $[3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ HMG)

Zugegebene Radioaktivität: 24'674 dpm / 0,01 ml, d.h. totale Aktivität $2,4674 \times 10^8$ dpm / 100 ml. Wachstum und Inkorporation: siehe Tabelle 3.

3.3.4. Algenkultur 4 ($[3\text{-}^{14}\text{C}]$ HMG + $[3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ HMG)

Zugegebene Radioaktivität: 19'992 dpm / 0,01 ml, d.h. totale Aktivität $1,9992 \times 10^8$ dpm / 100 ml. Wachstum und Inkorporation: siehe Tabelle 4.

Tag	Popul. -Dichte Mio Zellen/ml	I ₁ /0,1 ml	I ₂ /0,1 ml	Quot. %	Bem.
1	0,063				
2	0,355				
3	1,269				
4	3,168				
5	4,457				
6	5,805				
7	nicht gem.				
8	15,234				
9	nicht gem.				
10	nicht gem.	2236	1687	24,5	+ 50 µC 3- ¹⁴ C-HMG
11	23,141	1577	940	28,5	
12	26,406	1191	538	44,7	
13	32,266	1202	452	63,0	
14	keine Messungen				
15	42,226	1358	547	59,5	
16	37,832	992	429	56,3	
17	41,015	1101	441	60,3	
18	44,609	1005	382	61,8	Ernte

Tabelle 1

Wachstum und Inkorporation Algenkultur 1

Tag	Popul. -Dichte Mio Zellen/ml	I ₁ /0,1 ml	I ₂ /0,1 ml	Quot. %	Bem.
1	0,105				
2	0,378				
3	1,207				
4	2,746				
5	4,425				
6	5,457				
7	nicht gem.				
8	19,211				+ 50 µC 4- ¹⁴ C-Valin
9	keine Messungen				
10	keine Messungen				
11	22,224	1007	522	48,2	
12	27,734	907	281	69	
13	31,758	835	167	80	
14	keine Messungen				
15	38,476	905	163	82	
16	40,800	782	143	81,7	
17	45,859	856	155	82	Ernte

Tabelle 2

Wachstum und Inkorporation Algenkultur 2

Tag	Popul. -Dichte Mio Zellen/ml	I ₁ /0,01 ml	I ₂ /0,01 ml	Quot. %	Bem.
1	0,084				
2	0,262				$\left\{ \begin{array}{l} + 1g \text{ } 3'-^2H_3 \\ \text{HMG} \\ + 50 \mu C \\ 3-^{14}C \text{ HMG} \\ + 10mg \text{ CoA} \end{array} \right.$
3	1,213				
4	1,585				
5	2,553	160	156	2,5	
6	4,420	152	139	8,5	
7	keine Messungen				
8	11,020	81	35	56,8	
9	13,250	86	32	62,8	
10	16,238	86	38	55,9	
11	20,313	86	52	39,5	
12	24,510	86	29	66,2	
13	28,750	93	35	62,2	
14	keine Messungen				
15	47,225	87	44	49,4	
16	50,95	100	28	72,0	Ernte

Tabelle 3

Wachstum und Inkorporation Algenkultur 3

Tag	Popul. -Dichte Mio Zellen/ml	I ₁ /0,01 ml	I ₂ /0,01 ml	Quot. %	Bem.
1	0,098				
2	0,223				$\left\{ \begin{array}{l} + 1g [3'-^2H_3] \\ \text{HMG} \\ + 50 \mu C \\ [3-^{14}C] \text{HMG} \end{array} \right.$
3	0,918				
4	1,285				
5	2,713	170	173	0	
6	4,440	180	160	11,2	
7	keine Messungen				
8	9,895	99	42	57,6	$+ 1g [3'-^2H_3] \text{HMG}$
9	12,620	94,2	49,8	47	
10	17,413	101	42	58,5	
11	22,288	103	41	60,2	
12	31,275	153	48	68,6	
13	38,175	88,5	43,2	51,1	
14	keine Messungen				
15	49,825	107	56	47,6	Ernte

Tabelle 4

Wachstum und Inkorporation Algenkultur 4

3.4. Ernte der Algen, Extraktion

Zur Abtrennung der Algenzellen von der Nährlösung wurde die Zellsuspension je in 4 l Liter-Zentrifugenbechern bei 2500 Upm zentrifugiert. Nach gründlichem Nachwaschen wurden die Nasszellen auf -20°C gekühlt und lyophilisiert. Trockengewicht je Fermentoransatz: je ca. 10 g. Die Zellen wurden in einem 250 ml-Zentrifugenglas 5 mal erst je mit 100 ml CH_3OH übergossen und 10 Minuten lang mit einem Polytron-Homogenisator bei ca. 25'000 Upm behandelt. Dann wurde zur Methanol/Algenhomogenatmischung 3 mal 10 ml und 2 mal 30 ml Aether dazugegeben und je 10 Minuten lang bei 1000 Upm zentrifugiert (das Extrahieren der Algen mit dem Homogenisator mit einem Methanol/Aethergemisch von Anfang an bewährte sich wegen Siedeverzügen des Aethers infolge der Reibungswärme nicht). Die vereinigten Extrakte wurden über Celite durch eine 3 D_4 -Fritte filtriert.

3.5. Verseifung der Extrakte

Die Extrakte samt der Extraktionslösung wurden mit 45 g KOH in 100 ml CH_3OH versetzt, mit N_2 überschichtet und 24 Stunden lang stehen gelassen. Aliquote von je 120 ml wurden mit 360 ml H_2O verdünnt und mit 360 ml Aether extrahiert. Die Extraktion wurde mit 180, 120 und 90 ml wiederholt. Die vereinigten Aetherextrakte wurden mehrmals mit je 200 ml H_2O neutral gewaschen.

3.6. Hypophasen-/Epiphasen-Trennung

Die eingeengten Aetherextrakte wurden in 330 ml 90proz. CH_3OH gelöst und mit 400 ml Petroläther (30-60 $^{\circ}$) geschüttelt. Die Petrolätherphase wurde mit 100 und 50 ml 90proz. CH_3OH nachextrahiert. Zur weiteren Verwendung wurde nur die Hypophase verwertet. Anstatt das $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ -Gemisch einzuengen, wurde gleichviel Aether dazugegeben und mit ges. NaCl-Lösung die Pigmente in die Aetherphase gebracht; diese wurde anschliessend mit Na_2SO_4 getrocknet

und eingeengt. Bis zur Chromatographie wurden die hypophasischen Extrakte in 15 ml Laufmittelgemisch (s.u.) und 35 ml Aether aufbewahrt.

3.7. Chromatographie der Hypophase

Eine kurze Säule ($\emptyset = 5$ cm) wurde mit MgO schichtenweise bis zu einer Höhe von 12-15 cm trocken unter Beklopfen und Pressen mit einem Stopfen eingefüllt, mit wenig Seesand bedeckt und mit Glaskügelchen zunehmender Grösse überschichtet. Ein passender Alublock beschwerte das Säulenmaterial. Unter schwachem Vakuum wurde mit Petroläther (30-60°)/Isopropanol (10:1) eluiert. Die den noch vorhandenen restlichen epiphasischen Carotinene entsprechende nächstfolgende war die Hauptzone und entsprach dem Lutein. Diese Zone wurde aufgefangen, eingedampft und der Rückstand 3 bis 4 mal bis zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert.

3.8. Radioaktivitätsmessungen an Extrakten und an Lutein

3.8.1. Algenkultur 1

- a) Methanol-Extrakt: 563 dpm/0,01 ml, d.h. total $1,4075 \times 10^7$ dpm/250 ml
- b) Abgetrenntes aus Verseifung (Chlorophyll, alkalische Phase):
54,2 dpm/0,01 ml, d.h. total $2,61 \times 10^7$ dpm/5 Liter
- c) Lutein: 1. Kristallisation: 7485 dpm/mg, d.h. total
 $4,4 \times 10^5$ dpm/58,7 mg
- 2. Kristallisation: 6925 dpm/mg (55,6 mg)
- 3. Kristallisation: 6875 dpm/mg (47,5 mg)
- 4. Kristallisation: 6782 dpm/mg (41,6 mg)

3.8.2. Algenkultur 2

- a) Methanol-Extrakt: 307 dpm/0,01 ml, d.h. total $1,535 \times 10^7$ dpm/500 ml
- b) Abgetrenntes aus Verseifung: 585 dpm/0,01 ml, d.h. total

- 1,462 x 10⁸ dpm/2,5 Liter (?)
- c) Lutein: 1. Kristallisation: 1528 dpm/mg, d.h. total
1,095 x 10⁵ dpm/71,1 mg
2. Kristallisation: 1473 dpm/mg (57,6 mg)
3. Kristallisation: 1507 dpm/mg (51,0 mg)

3.8.3. Algenkultur 3

- a) Methanol-Extrakt: 159 dpm/0,01 ml, d.h. total 8,745 x 10⁶ dpm/
550 ml
- b) Abgetrenntes aus Verseifung: 52 dpm/0,01 ml, d.h. total
1,95 x 10⁷/3,75 Liter
- c) Lutein: 1. Kristallisation (62 mg): nur %²H bestimmt; kein mess-
barer Anteil ²H gefunden.
2. Kristallisation: 5243 dpm/mg (53,6 mg)
3. Kristallisation: 5351 dpm/mg (41 mg)
4. Kristallisation: 5243 dpm/mg (29 mg)

3.8.4. Algenkultur 4

- a) Methanol-Extrakt: 97 dpm/0,01 ml, d.h. total 4,85 x 10⁶ dpm/
500 ml
- b) Abgetrenntes aus Verseifung: 37,8 dpm/0,01 ml, d.h. total
1,5876 x 10⁷/4,2 Liter
- c) Lutein: 1. Kristallisation: 6547 dpm/mg, d.h. total
3,347 x 10⁵ dpm/52,8 mg
2. Kristallisation: 6154 dpm/mg (50,0 mg)
3. Kristallisation: 6339 dpm/mg (44,6 mg)

4. Inkorporationsversuche in Speisekürbis, Extraktion, Aufarbeitung

Die am 28.4.1975 ausgesäten Kürbisse der Sorte "Orange Knirps" wurden am 8.8.1975 je mit 1 ml 10proz. $[3',3',3'\text{-}^2\text{H}_3]$ HMG - K-Salzlösung (1 ml = 100 mg) in der Nähe des Stengels angeimpft und am 1.9.1975 geerntet (Frischgewicht 7230 g), in Stücke geschnitten, mit einem Mixer zerkleinert und lyophilisiert. 1300 g Trockensubstanz wurde mit CH_3OH extrahiert, die Extrakte in Aether überführt und mit H_2O von den Zuckern getrennt. Der eingeengte Extrakt wurde in 400 ml CH_3OH gelöst und mit 45 g KOH in 100 ml CH_3OH während 2 Tagen bei RT. verseift. Aufarbeitung und Epiphasen/Hypophasen-trennung erfolgte auf gleiche Art wie bei den Algenextrakten.

4.1. Chromatographie und Kristallisation

Die Hypophase wurde nach [75] mit Petroläther (30-60⁰)/Benzol/Aceton (5:4:0,5) an Magnesiumhydroxidcarbonat/Kieselgel (3:1) in einer 12 cm langen und 3 cm breiten Säule chromatographiert. Die oberste der 3 Zonen teilte sich nach 16 Stunden Elution in zwei polarere und 3 nahe zusammen liegende unpolarere Zonen auf, deren mittlere dunkelrot, alle anderen gelb gefärbt waren. Diese dunkelrote Zone wurde herausgeschnitten und nochmals am gleichen Adsorbens mit Petroläther (30-60⁰)/Benzol/Aceton (10:4:1) chromatographiert. Von den 3 Zonen wurde die unterste isoliert und durch Umkristallisation aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 11 mg kristallines Lutein erhalten. Die übrigen Zonen wurden nicht näher untersucht.

UV./VIS. (Aethanol, qualitativ): 474-475, 446-447, 420

(identisch mit Lutein nach [75])

^2H -Bestimmung: Kein messbarer Anteil an ^2H gefunden.

5. Synthese von [17,17,17,17',17',17'-²H₆] Lycopin

5.1. (2E,6E)-1-O-Benzyl-3,7-dimethyl-2,6-octadien (108) (Geranylbenzyläther)

100 g (0,6483 Mol) Geraniol (107) wurden in 200 ml Dioxan gelöst und zu 17,5 g (0,712 Mol) NaH (d.h. ca. 35 g NaH-Oel-Dispersion) in 500 ml Dioxan in einem 2 Liter-Rundkolben mit Rührer, Rückflusskühler und Eintropftrichter getropft, so dass die Lösung nicht allzu stark schäumte. Ca. 1 Stunde wurde unter Rückfluss erhitzt, dann langsam 82 g (0,6477 Mol) Benzylchlorid in 200 ml Dioxan zutropft und vorsichtig eine Stunde unter Rückfluss erwärmt. Das starke Schäumen der Emulsion konnte durch Zugabe von wenig Aether gedämpft werden. Der Ansatz wurde über Nacht stehen gelassen und mit verd. HCl bis ca. pH 7-8 neutralisiert. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Aether aufgenommen und mit H₂O gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ wurde die gelbrötliche Lösung am Vakuum destilliert, Kp₁₅ = 175°C, Kp_{0,1} = 140-145°C. Ausbeute an 108 110-125 g (0,450-0,511 Mol, 69-79%).

NMR. (CCl₄): 7,19 (s, 5H, Ar-H); 5,05 und 5,32 (s und t, breit, je 1H, H-C(2) und H-C(6)); 4,39 (s, 2H, Benzyl-H); 3,92 (d, 2H, H₂C(1)); 2,04 (s, 4H, H₂C(4) und H₂C(5)); 1,60 (s, 3H, H₃C(8)); 1,56 (s, 6H, (Z)-H₃C(7) und H₃C(3)).

MS.: 244(2, M⁺); 153(5, M⁺ - C₇H₇); 136(10, M⁺ - C₇H₇OH, McLafferty-Umlagerung); 123(22, M⁺ - Benzyl-O-CH₂); 91(100, C₇H₇⁺); 69(75, (CH₃)₂C=CH-CH₂⁺).

C ₁₇ H ₂₄ O	Ber.	C	83,55	H	9,90%
(244,38)	Gef.	C	83,64	H	9,60%

5.2. (2E,6E)-8-O-Benzyl-2,6-dimethyl-2,6-octadienol (109)
(SeO₂-Oxidation von Geranylbenzyläther (108))

49 g (200,5 mMol) 108 wurden in 300 ml 95proz. Aethanol während

1,5 Stunden mit 11 g (99,1 mMol) SeO_2 unter Rückfluss erhitzt. Dabei schied sich zunächst schwarzes grobes, später rotes und fein verteiltes Se^0 ab. Nach Kühlung auf -20°C während ca. 1 Stunde wurde durch eine Glasfritte mit Celite filtriert. Nach dem Eindampfen wurde das rötlichgelbe Oel in Aether aufgenommen und 2 mal mit H_2O , 1 mal mit NaHCO_3 - und 1 mal mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und an Alox (Fluka) mit CH_2Cl_2 chromatographiert. Nach vollständigem Eluieren der weniger polaren Zone (überschüssiges 108) wurde sukzessive Aethanol zugegeben und damit alle polaren Anteile (Alkohole, Aldehyde, etc.) eluiert und gemeinsam aufgefangen. Die in [109] beschriebene Chromatographie an SiO_2 mit Hexan/Essigester bewährte sich nur bei kleineren Ansätzen und diente dazu, für ein NMR.-Spektrum genügend reines 109 darzustellen. Die Ausbeute an polaren Anteilen nach der Chromatographie betrug 16-30 g (61-115 mMol, 31-57% bezüglich total eingesetztem 108 und bezogen auf das Molekulargewicht von 109). Dazu wurden jeweils 15-30 g (61-122 mMol) 108, verunreinigt mit Se, zurückgewonnen.

Das isolierte Gemisch der polaren Anteile schied nach längerem Stehen immer wieder rotes Se^0 ab. Die angegebenen Ausbeuten können deshalb nur als Richtwerte angesehen werden. Für die weitere Synthese wurde keine Reinigung mehr vorgenommen.

NMR. (CDCl_3): 7,31 (s, 5H, Ar-H); 5,41 (m, breit, 2H, H-C(3) und H-C(7)); 4,48 (s, 2H, Benzyl-H); 4,0 (d, $J=7$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8)$); 3,90 (s, 2H, $\text{HO-H}_2\text{C}(1)$); 2,1 (s, breit, 4H, $\text{H}_2\text{C}(4)$ und $\text{H}_2\text{C}(5)$); 1,63 (s, 6H, $\text{H}_3\text{C-C}(2)$ und $\text{H}_3\text{C-C}(6)$).

5.3. (2E,6E)-8-O-Benzyl-2,6-dimethyl-2,6-octadienal (110) (MnO_2 -Oxidation der polaren Fraktionen)

36 g (ca. 148 mMol) polare Anteile, bestehend hauptsächlich aus 109 und 110 wurden in 1 Liter Essigsäureäthylester 6 Stunden lang bei RT. mit 330 g MnO_2 (Darstellung siehe Kap. X, 5.4.) intensiv ge-

schüttelt. Nach Filtration durch eine Glasfritte mit Celite und Abdestillieren des Lösungsmittels wurden ca. 30 g (115 mMol) gelbes Öl von aldehydischen Anteilen erhalten.

NMR. (CCl_4): Das Spektrum zeigt, dass es sich nicht um eine einheitliche Substanz handelt; auch konnte nicht eine gute Auflösung erreicht werden. Das Spektrum ist ähnlich demjenigen von 109. Bei 9,3 ppm ist deutlich das Signal eines Aldehyd-Protons sichtbar.

5.4. Darstellung des zur Allyloxydation verwendeten MnO_2

695 g (4,4 Mol) KMnO_4 wurden heiss gelöst in 4,5 Liter H_2O . Aus zwei Schütteltrichtern wurde gleichzeitig eine Lösung von 1014 g (6,0 Mol) $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ in 1,2 Liter H_2O und 400 g (10,0 Mol) NaOH in 1 Liter H_2O derart zugetropft, dass der pH-Wert immer zwischen 7 und 9 blieb und die Lösung noch KMnO_4 enthielt; am Ende des Zutropfens musste ggf. noch etwas nachdosiert werden. Die Suspension wurde daraufhin so oft je in 4 l Liter-Zentrifugenbechern bei ca. 1200 Upm je 15 Minuten lang zentrifugiert, bis die überstehende Lösung mit Sicherheit frei von KMnO_4 blieb. Nach jedem Dekantieren und Neuzufügen von dest. H_2O wurde der festsitzende Brei mit einem Rührwerk aufgewühlt.

5.5. (2E,6E)-8-O-Benzyl-2,6-dimethyl-2,6-octadien-1-carbonsäure (111) und -methylester (112) (alkalische Oxidation von 110 mit Ag_2O)

12 g (ca. 46,5 mMol) Aldehyd-Gemisch 110 wurden in 150 ml 4proz. NaOH -Lösung während 6 Stunden mit 16,5 g (70 mMol) Ag_2O mit 5proz. HCl neutralisiert und $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{O}$ über Celite abfiltriert und die Filtrerrückstände mit H_2O und Aether gut gewaschen. Das Filtrat wurde mit 5proz. HCl schwach gesäuert und mehrmals mit Aether extrahiert. Die vereinigten Aetherextrakte wurden mehrmals mit 3proz. NaOH extrahiert und diese zwecks Entfernung der Neutralteile mehrmals mit Aether gewaschen und wieder angesäuert, die Säuren in Aether aufgenommen, über MgSO_4 getrocknet und einge-

engt. Ausbeute 5-6 g (18-22 mMol, 38-47%) rohe Säure als gelbes, zähflüssiges Oel.

Die in [130] beschriebene Neutralisation des Oxidationsgemisches mit konzentrierter HNO_3 hatte sich nicht bewährt, da grosse Mengen von nitrosen Gasen entstanden und die Lösung trotz mehrmaligem Nachwaschen braun gefärbt blieb.

Anschliessend wurde die rohe Säure mit einem kleinen Ueberschuss Diazomethan in Aether (hergestellt nach [133]) verestert. Ausbeute an Ester 5,0-5,5 g (17,3-19,1 mMol, 37,2-41,1% bezüglich 109). Zur Reinigung wurde dieser im Kugelrohr destilliert, $K_{p0,01} = 150-155^\circ\text{C}$. Die Ausbeute nach der Destillation betrug 3,2 g (11,1 mMol, 23,9% bezüglich 109). Zur Mikroanalyse wurde der Ester an SiO_2 mit Hexan/Essigester (6:4) chromatographiert und nochmals im Kugelrohr destilliert.

NMR. (CCl_4): 7,20 (s, 5H, Aryl-H); 6,65 (t, $J=6$, 1H, H-C(3)); 5,36 (t, $J=6$, 1H, H-C(7)); 4,39 (s, 2H, Benzyl-H); 3,94 (d, $J=6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8)$); 3,60 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-\text{CO}(1)$); ~ 2,2 (m, breit, 4H, $\text{H}_2\text{C}(4)$ und $\text{H}_2\text{C}(5)$); 1,82 und 1,62 (2s, je 3H, $\text{CH}_3-\text{C}(2)$ und $\text{CH}_3-\text{C}(6)$).

MS.: 256(1, $\text{M}^+-\text{CH}_3\text{OH}$); 229(2, $\text{M}^+-\text{COOCH}_3$); 197(3, $\text{M}^+-\text{C}_7\text{H}_7$); 180(12, $\text{M}^+-\text{C}_7\text{H}_7\text{OH}$, McLafferty-Umlagerung); 165(11, $\text{M}^+-\text{C}_7\text{H}_7$); 121(17, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{OCH}_2^+$); 91(100, C_7H_7^+).

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$	Ber.	C	74,97	H	8,39%
(288,39)	Gef.	C	74,46	H	8,66%

5. 6. $[1,1\text{-}^2\text{H}_2]$ (2E,6E)-8-O-Benzyl-2,6-dimethyl-2,6-octadienol (113)
(Reduktion von 112 mit LiAlD_4)

10 g (34,7 mMol) Ester 112, gelöst in 30 ml abs. Aether, wurden langsam zu einer Lösung/Suspension von 1,22 g (29,1 mMol) LiAlD_4 in 30 ml abs. Aether zutropft, ca. 4 Stunden bei RT. gerührt und

dann vorsichtig mit Eisstückchen versetzt. Nach Neutralisation mit NH_4Cl -Lösung wurde die Aetherphase mit H_2O gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Ausbeute roh 8,19 g (31,2 mMol, 90%) 113. Es wurden analog weitere Ansätze zu 2,6, 4,0, 13,7 und 21,2 g Ester 112 gemacht. Zur Mikroanalyse wurde eine Probe im Kugelrohr destilliert, $\text{Kp}_{0,01}$: 150-160°C.

NMR. (CCl_4): 7,23 (s, 5H, Ar-H); 5,33 (m, breit, 2H, H-C(3) und H-C(7)); 4,38 (s, 2H, Benzyl-H); 3,92 (d, $J=7$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8)$); 3,27 (s, 1H, HO-C(1)); 2,03 (s, 4H, $\text{H}_2\text{C}(4)$ und $\text{H}_2\text{C}(5)$); 1,60 (s, 6H, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(2)$ und $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(6)$).

MS.: 262(1, M^+); 229(4, $\text{M}^+ - \text{CD}_2\text{OH}$); 174(3); 154(7, $\text{M}^+ - \text{C}_7\text{H}_7\text{OH}$, McLafferty-Umlagerung); 91(78, C_7H_7^+); 77(25, C_6H_5^+); 65(24); 51(23); 43(100).

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{D}_2\text{O}_2$	Ber.	C	77,81	H+D	9,31%
(262,4)	Gef.	C	77,48	H+D	9,39%

5.7. [1,1- $^2\text{H}_2$](2E,6E)-8-O-Benzyl-2,6-dimethyl-2,6-octadienyl-
bromid (114) (Bromierung von 113)

5,25 g (20 mMol) 113 in 80 ml abs. Aether wurden unter Eiskühlung mit 1,68 g (39,9 mMol) CaH_2 und 2,175 g (8 mMol, 0,755 ml) PBr_3 versetzt und 4-6 Stunden unter Kühlung gerührt. Zur Zerstörung von überschüssigem PBr_3 wurde etwas Methanol zugegeben, die Suspension durch eine Glasfritte mit Celite filtriert und bei RT. am Rotationsverdampfer eingengt. Das Bromid wurde ohne weitere Reinigung für die Darstellung von 115 roh eingesetzt.

NMR. (CCl_4): 7,20 (s, 5H, Aryl-H); 5,32 (t, breit, $J=7$, 1H, H-C(3)); 5,06 (s, breit, 1H, H-C(7)); 4,39 (s, 2H, Benzyl-H); 3,92 (d, $J=8$, $\text{H}_2\text{C}(8)$); 2,04 (s, breit, 4H, $\text{H}_2\text{C}(4)$ und $\text{H}_2\text{C}(5)$); 1,60 (s, 6H, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(2)$ und $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(6)$).

5.8. [8,8,8-²H₃] (2E,6E)-1-O-Benzyl-3,7-dimethyl-2,6-octadien (115)
(deuterierter Geranylbenzyläther)

Das rohe Bromid 114 aus 5,25 g (20,0 mMol) 113 in ca. 100 ml abs. Aether wurde unter Kühlung mit 420 mg (10,0 mMol) LiAlD₄, bei RT. weitere 5 Stunden gerührt und dann unter Kühlung H₂O zur Suspension gegeben. Die Aetherphase wurde mit H₂O, NH₄Cl-Lösung, H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Ausbeute 4,0-4,9 g (16,16-19,81 mMol, 80,8-99,0%) rohes 115.

Im DC. (SiO₂/CH₂Cl₂) war neben 115 immer noch etwas Alkohol 113 (aus unvollständiger Bromierung) sichtbar. Deshalb erfolgte mittels Chromatographie an Alox (Fluka, auf Aktivität II gebracht) mit CH₂Cl₂ eine weitere Reinigung. Ausbeute an 115 1,50-1,54 g (6,06-6,23 mMol, 30,3-31,1%).

Total 7,7 g (31,1 mMol) wurden durch mehrere Kugelrohrdestillationen am HV. (0,08 Torr) destilliert. Eine Vorfraktion wurde bei 110°C abgetrennt, die Hauptfraktion bei 150°C, von welcher 4,35 g (17,6 mMol, 56,5% Destillationsausbeute) 115 erhalten werden konnte.

Eine stimmende C,H-Analyse konnte trotz wiederholter Chromatographie und Destillation nicht erreicht werden.

NMR. (CCl₄): 7,20 (s, 5H, Aryl-H); 5,32 (t, breit, J=7, 1H, H-C(6)); 5,06 (s, breit, 1H, H-C(2)); 4,39 (s, 2H, Benzyl-H); 3,92 (d, J=7, H₂C(1)); 2,04 (s, breit, 4H, H₂C(4) und H₂C(5)); 1,60 (s, 6H, H₃C-C(3) und H₃C-C(7)).

¹³C-NMR. (d₆-Aceton):

139,240, 138,942, 130,964 (3s, je 1 C, quat. C(7)/C(3)/C(1')); 128,166, 127,484 (2d, je 2 C, tert. C(2')/C(3')/C(5')/C(6')); 127,189, 124,309, 121,878 (3d, je 1 C, tert. C(4')/C(2)/C(6)); 71,579 (t, 1 C, sek. C(7')); 66,619 (t, 1 C, sek. C(1)); 39,790 (t, 1 C, sek. C(4)); 26,687 (t, 1 C, sek. C(5)); 17,567 (q, 1 C, prim.

(Z)-CH₃-C(7)); 16,365 (q, 1 C, prim. CH₃-C(3)).
(Anmerkung: Aromaten(Benzyl)-C sind von 1' bis 7' nummeriert; untereinander nicht zugeordnete C sind durch Schrägstrich (/) voneinander getrennt).

MS.: 247(2, M⁺); 156(5, M⁺- C₇H₇); 139(15, M⁺- C₇H₇OH); McLafferty-Umlagerung); 126(16, M⁺- Benzyl-O-CH₂); 91(100, C₇H₇⁺); 72(75, CD₃C(CH₃)=CH-CH₂⁺).

5. 9. [8,8,8-²H₃] (2E,6E)-3,7-dimethyl-2,6-octadienol (116)
([8,8,8-²H₃] Geraniol; Benzylätherspaltung)

1 g (4,04 mMol) Benzyläther 115 wurden in 25 ml trockenem THF in einem 250 ml-Dreihalskolben gelöst und auf -78°C gekühlt. Ueber einen zwischengeschalteten Kolben wurden ca. 100 ml (68 g) Diäthylamin (wasserfrei) einkondensiert. Unter ständigem schwachem N₂-Strom wurden nach und nach kleine, zuvor in Aethanol aktivierte Li-Stückchen (Merck Nr. 5660) zugegeben und gerührt, bis die intensiv blaue Farbe auch nach Entfernen von allem Li deutlich 15-30 Minuten lang bestehen blieb. Mit wenig Methanol wurde darauf das überschüssige Li zerstört und nach Erwärmen auf RT. bis zur klaren Lösung H₂O zugegeben. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die zurückbleibende Wasserphase wurde mehrmals mit Aether extrahiert, die vereinigten Aetherextrakte 2 mal mit H₂O und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Ausbeute roh: 575-630 mg (3,66-4,00 mMol, 90,5-99,1%) 116. Die leicht gelbliche Lösung wurde im Kugelrohr destilliert, Kp_{0,08}: 70°C. Ausbeute nach Destillation: 313-353 mg (1,99-2,24 mMol, 49,2-55,5%) 116.

NMR. (CCl₄): 5,35 (t, breit, J=7, 1H, H-C(6)); 5,08 (s, breit, 1H, H-C(2)); 4,03 (d, J=7, 2H, HO-H₂C(1)); 3,22 (s, 1H, HO-H₂C(1)); 2,02 (s, 4H, H₂C(4) und H₂C(5)); 1,64 und 1,60 (2s, je 3H, H₃C-C(3) und H₃C-C(7)).

MS.: 157(7, M^+); 139(6, $M^+ - H_2O$); 126(11, $M^+ - CH_2OH$);
111(11); 93(21); 84(16); 72(100, $CD_3 - C(CH_3)=CH-CH_2^+$).

$C_{10}H_{15}D_3O$	Ber.	C	76,37	H+D	11,75%
(157,28)	Gef.	C	76,53	H+D	12,11%

5. 10. $[8,8,8-^2H_3]$ (2E,6E)-1-Bromo-3,7-dimethyl-2,6-octadien (117)
($[8,8,8-^2H_3]$ Geranyl bromid)

1,0 g (6,36 mMol) 116 wurden in 2,5 ml Petroläther (30-60°) und 0,1 ml Pyridin gelöst. Bei -25°C wurden mit einer Mikrospritze 720 mg (2,66 mMol, 0,250 ml) PBr_3 zugetropft und danach 30 Minuten lang gerührt, dann 4 ml Eiswasser dazugegeben. Die Petrolätherextrakte wurden mit H_2O und ges. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Ausbeute roh: ca. 1,3 g (5,70 mMol, 92,7%). Das rohe Bromid 117 wurde für die Wittig-Reaktion nicht weiter gereinigt.

5. 11. $[8,8,8-^2H_3]$ (2E,6E)-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl-1-triphenylphosphoniumbromid (118) ($[8,8,8-^2H_3]$ Geranyl-triphenylphosphoniumbromid)

Zu 1,3 g (5,9 mMol) rohem Bromid 117 (aus 1 g 116) wurden 1,490 g (5,680 mMol) Triphenylphosphin in 13 ml Benzol gegeben, die Lösung 24 Stunden bei RT. gerührt und dann der weisse Niederschlag abfiltriert und im HV. getrocknet. Das rohe Phosphoniumbromid wurde in 10 ml Aceton ausgekocht, abfiltriert und am HV. bei 35°C getrocknet. Ausbeute 1,450 g (3,00 mMol, 47,3%) 118.

$C_{28}H_{29}D_3PBr$	Ber.	C	69,70	H+D	6,76	Br	16,56%
(482,48)	Gef.	C	68,69	H+D	6,49	Br	17,39%

5. 12. $[17,17,17,17',17',17'-^2H_6]$ Lycopin (119)
(Wittig-Reaktion)

200 mg (0,415 mMol) 118 in 2 ml abs. Aether wurden mit 0,5 ml (0,5 mMol) 1N $NaOCH_3$ -Lösung versetzt. Nach ca. 40 Minuten Rüh-

ren wurden 40 mg (0,135 mMol) Crocetindialdehyd in 1,5 ml CH_2Cl_2 zugegeben und 24 Stunden lang bei RT. gerührt, mit CH_2Cl_2 verdünnt, mit ges. NH_4Cl -Lösung, NaHCO_3 -Lösung, H_2O und ges. NaCl -Lösung gewaschen und über wenig MgSO_4 getrocknet. Das tiefrote Rohcarotin wurde mit Toluol an SiO_2 chromatographiert und aus CH_2Cl_2 /Aethanol resp. CS_2 /Aethanol umkristallisiert. Ausbeute 32,5-44,5 mg (0,060-0,082 mMol, 44,4-60,7%) 119.

UV./VIS. (Hexan): 443 (117'000), 469 (170'000), 500 (150'000)

Vergleich: undeutertes Lycopin, auf gleiche Weise synthetisiert:

UV./VIS. (Petroläther): 443 (118'200), 469 (174'800), 500 (156'400).

NMR. (CDCl_3): 5,8-6,8 (m, 14H, Methin-H ab H-C(6));
5,14 (s, breit, 2H, H-C(2) und H-C(2'));
2,15 (m, 8H, $\text{H}_2\text{C}(3)$, $\text{H}_2\text{C}(3')$, $\text{H}_2\text{C}(4)$ und $\text{H}_2\text{C}(4')$); 1,98 (s, 12H, $\text{H}_3\text{C}(18)$, $\text{H}_3\text{C}(18')$, $\text{H}_3\text{C}(19)$ und $\text{H}_3\text{C}(19')$); 1,84 (s, 6H, $\text{H}_3\text{C}(5)$ und $\text{H}_3\text{C}(5')$); 1,72 (m, Anteil von (E)- $\text{D}_2\text{HC}(17)$ und (E)- $\text{D}_2\text{HC}(17')$); 1,65 (s, 6H, (Z)- $\text{H}_3\text{C}(16)$ und (Z)- $\text{H}_3\text{C}(16')$).

MS.: 542(100, M^+); 470(6, M^+ - $\text{CD}_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2$);
450(11, M^+ - Toluol); 436(24, M^+ - Xylol);
119(38, $(\text{C}_7\text{H}_5)(\text{CH}_3)_2^+$); 105(53, $(\text{C}_7\text{H}_6)(\text{CH}_3)^+$);
91(71, $(\text{C}_7\text{H}_7)^+$).

XI. Literaturverzeichnis

- [1] O. Straub, Key to Carotenoids, Birkhäuser Verlag, Basel 1976.
- [2] Carotenoids, Ed. O. Isler, H. Gutmann & U. Solms, Birkhäuser Verlag, Basel 1971. Aus diesem Werk stammen auch die folgenden Zitate [3] - [46].
- [3] N.I. Krinsky in [2].
- [4] T.W. Goodwin in [2].
- [5] M.J. Coon, F.P. Kupiecki, E.E. Dekker, M.J. Schlesinger & A. del Campillo in "Biosynthesis of Terpenes and Sterols", Ed. G.E.W. Wolstenholme und M. O'Connor (Churchill, London 1959), S. 62.
- [6] W.H. Schopfer, E.C. Grob & G. Besson, Arch. sci. (Geneva) 5, 5 (1952).
- [7] P.A. Tavormina, M.H. Gibbs & J.W. Huff, J. Am. Chem. Soc. 78, 4498 (1956).
- [8] G.D. Braithwaite & T.W. Goodwin, Biochem. J. 76, 1,5,194 (1960).
- [9] C.O. Chichester, H. Yokoyama, T.O.M. Nakayama, A. Lukton & G. Mackinney, J. Biol. Chem. 234, 598 (1959).
- [10] H. Yokoyama, C.O. Chichester & G. Mackinney, Nature 185, 687 (1960).
- [11] G. Mackinney, B.V. Chandler & A. Lukton, Proc. 4th Internat. Congr. Biochem. 1958, Vol. 15 (Pergamon Press, Oxford 1960), S. 130.
- [12] E.C. Grob in "Biosynthesis of Terpenes and Sterols", Ed. G.E.W. Wolstenholme & M. O'Connor (Churchill, London 1959), S. 267.

- [13] D.G. Anderson, D.W. Norgard & J.W. Porter, Arch. Biochem. Biophys. 88, 68 (1960).
- [14] L.F. Krzeminsky & F.W. Quackenbush, Arch. Biochem. Biophys. 88, 287 (1960).
- [15] V.V. Modi & D.K. Patwa, Enzymologia 23, 27 (1961).
- [16] T.W. Goodwin in [5], S. 279.
- [17] E.A. Shneour & I. Zabin, J. Biol. Chem. 234, 770 (1959).
- [18] A.E. Purcell, G.A. Thompson & J. Bonner, J. Biol. Chem. 234, 1081 (1959).
- [19] D.R. Threlfall, unpubl. obs., ref. T.W. Goodwin in [2].
- [20] T.W. Goodwin, Biochem. J. 70, 612 (1958).
- [21] T.W. Goodwin & E.I. Mercer, in The Control of Lipid Metabolism (Biochem. Soc. Symp. Nr. 24) Ed. J.K. Grant (Academic Press London 1963), p. 37.
- [22] K.J. Treharne, E.I. Mercer & T.W. Goodwin, Biochem. J. 99, 239 (1966).
- [23] H.Y. Yamamoto, C.O. Chichester & T.O.M. Nakayama, Arch. Biochem. Biophys. 96, 645 (1962).
- [24] W.J. Steele & S. Gurin, J. Biol. Chem. 235, 2778 (1960).
- [25] B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning & F. Lynen, J. Biol. Chem. 235, 326 (1960).
- [26] D.H. Shah, W.W. Cleland & J.W. Porter, J. Biol. Chem. 240, 1946 (1965).
- [27] I.W. Cornforth, R.H. Cornforth, C. Donneringer, G. Popiak, G. Ryback & G.J. Schroepfer jr., Proc. Roy. Soc. Ser. B 163, 436 (1965).

- [28] B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning & F. Lynen, J. Amer. Chem. Soc. 81, 1254 (1959).
- [29] J.K. Dorsey, J.A. Dorsey & J.W. Porter, J. Biol. Chem. 241, 5353 (1966).
- [30] P.W. Holloway & G. Popiak, Biochem. J. 104, 57 (1967).
- [31] A.A. Kandutsch, H. Paulus, E. Levin & K. Bloch, J. Biol. Chem. 239, 2507 (1964).
- [32] a) F. Lynen, B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning & E.M. Moslein, Angew. Chem. 71, 657 (1959);
b) F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning & I. Kessel, Angew. Chem. 70, 738 (1958).
- [33] De W.S. Goodman & G. Popiak, J. Lipid Res. 1, 286 (1960).
- [34] G. Popiak, Tetrahedron Letters 19, 19 (1959).
- [35] E.C. Grob, K. Kirschner & F. Lynen, Chimia (Switz.) 15, 308 (1961).
- [36] D.L. Nandi & J.W. Porter, Arch. Biochem. Biophys. 105, 7 (1964).
- [37] F.B. Jungalwala & J.W. Porter, Arch. Biochem. Biophys. 119, 209 (1967).
- [38] A. Akhila & D.V. Banthorpe, Phytochem. 19, 1429 (1980).
- [39] T.W. Goodwin & R.J.H. Williams, Proc. Roy. Soc. Ser. B 163, 515 (1965).
- [40] F.W. Henning, in Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid (Biochem. Soc. Symp. Nr. 29), ed. T.W. Goodwin (Academic Press, London 1970), p. 105.
- [41] J.B. Davies, L.M. Jackmann, P.T. Siddons & B.C.L. Weedon, Proc. Chem. Soc. 1961, 261.

- [42] F.B. Jungalwala & J.W. Porter, Arch. Biochem. Biophys. 110, 291 (1965).
- [43] O.B. Weeks, in Aspects of Terpenoid Biochemistry, ed. T. W. Goodwin (Academic Press, London 1971).
- [44] R. Herber, B. Maudinas, J. Villoutreix & P. Granger, Biochem. Biophys. Acta 280, 194 (1972).
- [45] B. Maudinas, R. Herber, J. Villoutreix & P. Granger, Biochimia 54, 1085 (1972).
- [46] R.J.H. Williams, G. Britton, J.M. Charlton & T.W. Goodwin, Biochem. J. 104, 767 (1967).
- [47] M. Sugumaran & C.S. Vaidyanathan, J. Scient. Ind, Res. Vol. 36, 32 (1977).
- [48] C.D. Poulter & J.M. Hughes, J. Amer. Chem. Soc. 99, 3830 (1977).
- [49] L.J. Altman, D.R. Laungani, H.C. Rilling & J. Vasak, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1977, 860.
- [50] L.J. Altman, R.C. Kowersky & D.R. Laungani, J. Amer. Chem. Soc. 100, 6174 (1978).
- [51] B.H. Davies & R.F. Taylor, Pure Appl. Chem. 47, 211 (1976).
- [52] G. Britton, W.J.S. Lockley, N.J. Patel, T.W. Goodwin & G. Englert, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1977, 655.
- [53] J.D. Bu'Lock, D.J. Austin, G. Snatzke & L. Hruban, Chem. Comm. 1970, 255.
- [54] D.J. Austin, J.D. Bu'Lock & D. Drake, Experientia 26, 348 (1970).

- [55] A.G. Andrewes, S. Liaaen-Jensen & G. Borch, Acta chem. Scand. B 28, 737 (1974).
- [56] C.H. Eugster, Pure Appl. Chem. 51, 463 (1979).
- [57] R. Buchecker, R. Egli, H. Regel-Wild, Ch. Tschärner, C.H. Eugster, G. Uhde & G. Ohloff, Helv. 56, 2548 (1973).
- [58] R. Buchecker, P. Hamm & C.H. Eugster, Helv. 57, 631 (1974).
- [59] B.H. Davies, Pure Appl. Chem. 51, 623 (1979).
- [60] R. Buchecker & C.H. Eugster, Helv. 54, 327 (1971).
- [61] R.J.H. Williams, G. Britton & T.W. Goodwin, Biochem. J. 105, 99 (1967).
- [62] H. Rønneberg, G. Borch, S. Liaaen-Jensen, H. Matsutaka & T. Matsuno, Acta chem. Scand. B 32, 621 (1978).
- [63] A.G. Andrewes, G. Borch & S. Liaaen-Jensen, Acta chem. Scand. B 30, 214 (1976).
- [64] A.G. Andrewes, G. Borch & S. Liaaen-Jensen, Acta chem. Scand. B 31, 212 (1977); S. Hertzberg & S. Liaaen-Jensen, ibid. B 31, 215 (1977).
- [65] I.R. Vose, G. Britton & T.W. Goodwin, unpubl. obs., ref. in [4].
- [66] D. Fahey & B.V. Milborrow, Phytochemistry 17, 2077 (1978).
- [67] M. Hallénstvet, R. Buchecker, G. Borch & S. Liaaen-Jensen, Phytochemistry 16, 583 (1977).
- [68] J.L. Rabinowitz, Biochemical Preparations 6, 25 (1958).
- [69] Org. Synthesis 36, 60 (1956).
- [70] M.S. Kharasch & Ch.H. Fuchs, J. Org. Chem. IX, 359 (1944).

- [71] B. Sorokin, Liebigs Ann. Chem. 185, 169 (1877).
- [72] A. Saytzeff, J. Prakt. Chem. [2] 76, 100 (1907).
- [73] F.W. Miller, Chem. Eng. News 51, 29 (1973).
- [74] P.A. Bütikofer, Diplomarbeit Universität Zürich 1975.
- [75] H. Nitsche & K. Egger, Phytochem. 1969, 1577.
- [76] F. Isenring, geplante Diss. Universität Zürich.
- [77] H.P. Märki, Diss. Universität Zürich 1980.
- [78] H.P. Märki & C.H. Eugster, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1980, 527.
- [79] P.M. Bramley & B.H. Davies, Phytochem. 1975, 463.
- [80] P.M. Bramley & B.H. Davies, Phytochem. 1976, 1913.
- [81] J.W. Porter, Pure Appl. Chem. 20, 472 (1969).
- [82] S.C. Kushwaha, C. Subbarayan, D.A. Beeler & J.W. Porter, J. Biol. Chem. 244, 3635 (1969).
- [83] S.C. Kushwaha, G. Suzue, C. Subbarayan & J.W. Porter, J. Biol. Chem. 245, 4708 (1970).
- [84] H.M. Hill, S.K. Calderwood & L.J. Rogers, Phytochem. 1971, 2051.
- [85] J.W. Cornforth & R. Cornforth, Biochem. Soc. Symp 29, 5 (1970).
- [86] G. Popiak, Biochem. Soc. Symp. 29, 17 (1970).
- [87] T.W. Goodwin, Biochem. J. 123, 293 (1971).
- [88] T.W. Goodwin, Pure Appl. Chem. 51, 593 (1979).

- [89] G. Britton, W.J.S. Lockley, R. Powls, T.W. Goodwin & L.M. Heyes, *Nature* 268, 81 (1977).
- [90] J.C.B. McDermott, D.J. Brown, G. Britton & T.W. Goodwin, *Biochem. J.* 144, 231 (1974).
- [91] H.H. Strain, M.R. Thomas, H.L. Crespi & J.J. Katz, *Biochem. Biophys. Acta* 52, 517 (1961).
- [92] H. Brzezinka, B. Johannes & H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* 29b, 429 (1974).
- [93] U. Schwieter, G. Englert, N. Rigassi & W. Vetter, *Pure Appl. Chem.* 20, 365 (1969).
- [94] J.D. Surmatis & A. Ofner, *J. Org. Chem.* 26, 1171 (1961).
- [95] H.H. Inhoffen, O. Isler, G. v. Der Bey, G. Raspé, P. Zeller & R. Ahrens, *Liebigs Ann. Chem.* 583, 7 (1953).
- [96] O. Isler, W. Huber, A. Ronco & M. Kofler, *Helv.* 30, 1911 (1947).
- [97] O. Isler, A. Ronco, W. Guex, N.C. Hindley, W. Huber, K. Dialer & M. Kofler, *Helv.* 32, 489 (1949).
- [98] O. Isler, H. Lindlar, M. Montavon, R. Rüegg, G. Saucy & P. Zeller, *Helv.* 39, 2041 (1956).
- [99] D.E. Loeber, S.W. Russel, T.B. Toubé, B.C.L. Weedon & J. Diment, *J. Chem. Soc. C* 1971, 404.
- [100] R. Entschel & P. Karrer, *Helv.* 41, 402 (1958).
- [101] P. Zeller, F. Bader, H. Lindlar, M. Montavon, P. Müller, R. Rüegg, G. Ryser, G. Saucy, S.F. Schaeren, U. Schwieter, K. Stricker, R. Tamm, P. Zürcher & O. Isler, *Helv.* 42, 841 (1959).

- [102] H. Budzikiewicz, H. Brzezinka & B. Johannes, *Mh. Chem.* 101, 579 (1970).
- [103] H. Kjsen, S. Liaaen-Jensen & C.R. Enzell, *Acta Chem. Scand.* 25, 85 (1971).
- [104] H. Kjsen, *Diss. Univ. Trondheim* 1972.
- [105] J.E. Johansen & S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand. B* 28, 301 (1974).
- [106] A. Eidem & S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand B* 28, 273 (1974).
- [107] J.P. Schaefer, M.J. Pagani & D.S. Weinberg, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 6938 (1967).
- [108] J.E. Johansen & S. Liaaen-Jensen, *Acta Chem. Scand. B* 28, 349 (1974).
- [109] L.J. Altmann, L. Ash & St. Marson, *Synthesis* 1974, 129.
- [110] D. Arigoni, A. Vasella, K.B. Sharpless & H.P. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7917 (1973).
- [111] H.P. Jensen & K.B. Sharpless, *J. Org. Chem.* 40, 264 (1975).
- [112] a) U.T. Bhalerao & H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 4835 (1971);
b) U.T. Bhalerao & H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 5311 (1971).
- [113] K.J. Clark, G.I. Fray, R.H. Jaeger, Sir R. Robinson, *Tetrahedron* 1959, 217.
- [114] R.G. Gaughan & C.D. Poulter, *J. Org. Chem.* 44, 2441 (1979).

- [115] E.E. van Tamelen, S.A. Marson, J. Am. Chem. Soc. 97, 5614 (1975).
- [116] M.A. Umbreit & K.B. Sharpless, J. Am. Chem. Soc. 99, 5526 (1977).
- [117] W.G. Taylor, J. Org. Chem. 44, 1020 (1979).
- [118] a) M. Schlosser, F.K. Christmann, A. Piskala, D. Coffinet, Synthesis 1971, 29;
b) M. Schlosser & D. Coffinet, Synthesis 1971, 380;
c) M. Schlosser & D. Coffinet, Synthesis 1972, 575.
- [119] R.M. Coates, D.A. Ley & P.L. Cavender, J. Org. Chem. 43, 4915 (1978).
- [120] Y. Masaki, K. Hashimoto & K. Kaji, Tetrahedron Lett. 1978, 4539.
- [121] Y. Masaki, K. Hashimoto & K. Kaji, Tetrahedron Lett. 1978, 5123.
- [122] D.A. Evans, G.C. Andrews, T.T. Fujimoto, D. Wells, Tetrahedron Lett. 1973, 1385.
- [123] T. Suga, T. Hirata, Y. Hirano & T. Ito, Chem. Lett. 1976, 1245.
- [124] N. Rabjohn, Organic Reactions, Vol. 24, 261 (1976).
- [125] R.W. Denny & A. Nickon, Organic Reactions, Vol. 20, 133 (1973).
- [126] E.E. van Tamelen, Accounts Chem. Res. 1, 111 (1968).
- [127] T. Inoue, T. Uchimaru & T. Mukaijama, Chem. Lett. 1977, 1215.
- [128] B. Trost & L. Weber, J. Org. Chem. 40, 3617 (1975).

- [129] M. Kelley, S.A. Andresen & S. Liaaen-Jensen, Acta Chem. Scand. 25, 1607 (1971).
- [130] F. Asinger, Chem. Ber. 75, 656 (1942).
- [131] E.J. Corey, N.W. Gilman & B.E. Ganem, J. Am. Chem. Soc. 90, 5616 (1968).
- [132] J. Attenburrow, A.F.B. Cameron, J.H. Chapman, R.M. Evans, B.A. Hems, A.B.A. Jansen & T. Walker, J. Chem. Soc. 1952, 1094.
- [133] Organic Synthesis, Vol. 36, 16
- [134] E.J. Corey, D.E. Cane & L. Libit, J. Am. Chem. Soc. 93, 7016 (1971).
- [135] O. Isler, H. Gutmann, H. Lindlar, A. Montavon, R. Rüegg, G. Ryser & P. Zeller, Helv. 39, 463 (1956).
- [136] A. Eidem, R. Buchecker, H. Kjösen & S. Liaaen-Jensen, Acta Chem. Scand. B 29, 1015 (1975).
- [137] U. Vögeli & W. von Philipsborn, Org. Magn. Reson. 7, 617 (1975).
- [138] A. Zumbrunn, geplante Dissertation Universität Zürich.

Curriculum vitae

Am 12. Januar 1944 wurde ich, Arnold Hofer, Bürger von Rothrist AG, in Rothrist geboren. Nach dem Besuch der Primar- und der Bezirksschule in Rothrist trat ich im Jahr 1960 in die Literarabteilung der Aargauischen Kantonsschule in Aarau ein, welche ich 1964 mit der Maturitätsprüfung Typus B abschloss. Im Herbst 1965 immatrikulierte ich mich an der Abteilung III B der ETH Zürich, wechselte dann aber im Frühjahr 1966 an die Universität Zürich, um ein Chemiestudium zu beginnen. Das Grundstudium beendete ich im Frühjahr 1974 mit dem Diplom als Naturwissenschaftler mit Hauptfach Organische Chemie. Anschliessend begann ich mit der Dissertation, deren experimentellen Teil ich im Herbst 1978 beendete. Sowohl die Diplomarbeit als auch die Dissertation standen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C.H. Eugster.

Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen, Uebungen und Praktika bei Frau Prof. Dr. V. Meyer und den Herren Professoren und Dozenten K. Bernauer, K. Bauknecht, R. Buchecker, P.S. Chen, A.S. Dreiding, C.H. Eugster, H. Fischer, H. Frohofer, F. Gimmi, E. Hadorn, H.J. Hediger, W. Heitler, M. Hesse, H. Labhart, F. Leuthardt, W. Ludwig, H.R. Oswald, W. von Philipsborn, P. Rüedi, Ch. Schlatter, H. Schmid, Th. Stalder, B. Thüeler, M. Viscontini, B.L. van der Waerden, G. Wagnière, F. Waldner, H. Wanner, H. Werner, O. Woodtli, V. Ziswiler.

Von 1975 bis 1978 war ich Praktikumsassistent des Medizinerpraktikums, von 1978 bis 1980 Vorlesungsassistent am Organisch-Chemischen Institut der Universität Zürich.

